UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES de MARSEILLE

N° D'ORDRE : 22

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

Faculté des Sciences de Marseille

POUR L'OBTENTION DU

GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Magdeleine HUSSET-BIERRY

1re THÈSE : **Recherches sur la nature et le dosage des glucides du lait de femme**

2e THÈSE : **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le 7 AVR 1943 1943, devant la Commission d'Examen :

MM. M. KOLLMANN, *Président.*
P. CHOUX,
J. ROCHE,
G. DENIZOT, } *Examinateurs.*

LONS-LE-SAUNIER.
MAURICE DECLUME, IMPRIMEUR-ÉDITEUR.

1943

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES de MARSEILLE

N° D'ORDRE : 22

THÈSES

PRÉSENTÉES A LA

Faculté des Sciences de Marseille

POUR L'OBTENTION DU

GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

Magdeleine HUSSET-BIERRY

1re THÈSE : **Recherches sur la nature et le dosage des glucides du lait de femme.**

2e THÈSE : **Propositions données par la Faculté.**

Soutenues le - 7 AVR 1943 1943, devant la Commission d'Examen :

MM. M. KOLLMANN, *Président.*
P. CHOUX,
J. ROCHE, } *Examinateurs.*
G. DENIZOT,

LONS-LE-SAUNIER.
MAURICE DECLUME, IMPRIMEUR-ÉDITEUR.

1943

UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

FACULTÉ DES SCIENCES DE MARSEILLE

Mort au Champ d'Honneur :
M. Fr. MARTY,
Maître de Conférences de Mathématiques
(14 juin 1940)

Doyen et Professeur honoraire :
M. MARCHAUD

Professeurs honoraires :
MM. M. CAULLERY, Ch. FABRY, E. FABRY, J. PERES,
L. HOULLEVIGUE, J. COTTE, E. DECROCK

Doyen : M. G. CORROY ; **Assesseur :** M. A. TIAN ;
Secrétaire : M. A. CASTELLA

Professeurs :

MM.	
H. BUISSON	Physique générale
P. SEVE	Physique industrielle
A. TIAN	Chimie générale
M. KOLLMANN	Zoologie générale
H. BIERRY	Physiologie
J. BOSLER	Astronomie
E. TRAYNARD	Calcul différentiel et intégral
L. MARGAILLAN	Chimie industrielle.
G. CORROY	Géologie et Minéralogie.
P. CHOUX	Botanique générale
E. RAYMOND	Chimie P. C. B.
R. THIRY	Mécanique rationnelle et Mécanique des fluides
G. PETIT	Biologie animale.
H. PRAT	Biologie végétale.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Maîtres de Conférences :

MM.	
C. JAUSSERAN	Physique P. C. B.
ROGER (1)	Mathématiques.
L. SACKMANN	Mécanique des fluides

Chargés de Conférences :

MM.	
J. ROCHE	Chimie Biologique
G. DENIZOT	Géographie physique et Géologie appliquée
E. CALVET	Chimie générale
J. TIMON-DAVID	Zoologie agricole
A. FAVRE	Mécanique des fluides

Maîtres de Conférences honoraires :
MM. E. MEISSONNIER, L. LAURENT, H. BIMAR

(1) *Prisonnier de guerre. Suppléé par M. E. BLANC*

A MA MÈRE

A MON PÈRE LE PROFESSEUR BIERRY

A MON MARI LE DOCTEUR JEAN HUSSET

AUX MIENS

A MES AMIS

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur KOLLMANN

en respectueux hommage.

A NOTRE JURY DE THÈSE

avec l'expression de notre profonde gratitude.

AVANT-PROPOS.

Les femelles des Mammifères élaborent, après la naissance du jeune, un liquide caractéristique qui ne tarde pas, au bout d'un temps variable, à prendre une composition constante : c'est le lait, sécrétion du parenchyme mammaire en lactation.

Le lait est produit en vue de la nourriture du jeune individu pour lequel il constitue un aliment indispensable et complet. D'aucuns voient ainsi se réaliser une continuation de la vie intra-utérine, dans des conditions de nutrition assez semblables, pour le nouveau-né qui, au cours des premiers jours de sa vie indépendante, reçoit ainsi une nourriture d'origine exclusivement maternelle.

De nombreux constituants : protides, lipides, glucides, sels minéraux, etc., entrent dans la composition du lait, et les valeurs relatives de ces constituants sont, d'une espèce à l'autre, sujettes à de fortes variations. Quoi qu'il en soit, le jeune va recevoir une alimentation lactée exclusive qui doit couvrir tous ses besoins (énergétiques, d'entretien, de croissance, etc.). Nous savons que, pour cela, trois grands principes : protides, lipides et glucides, sont nécessaires et que chacun d'eux doit se trouver, dans la ration, avec un minimum spécifiquement indispensable. Il est également démontré que le rôle des hydrates de carbone est primordial dans la nutrition et que le glucose doit être présent dans le sang et dans tous les tissus de façon permanente.

Bien que du galactose soit contenu en faibles proportions dans la lactalbumine et dans la caséine (Sörensen et Haugaard), c'est sous forme de lactose presque exclusivement que le jeune Mammifère doit recevoir les hydrates de carbone de sa ration ; la raison profonde nous en échappe. Toutefois, on a vérifié que, chez les jeunes enfants, la présence de sucre de lait en assez grande quantité dans l'alimentation favorise la fixation du calcium dans les os.

Mais le lactose est-il le seul glucide renfermé dans le lait ? On sait déjà qu'au point de vue de la teneur globale en glucides les laits des divers Mammifères présentent des variations

importantes, mais peut-être offrent-ils, en même temps, des différences au point de vue qualitatif. C'est ce que des recherches anciennes déjà et d'autres plus récentes ont tenté de montrer. En étudiant divers modes de déprotéinisation du lait de façon à réaliser des dosages précis du lactose et des glucides qui peuvent l'accompagner, nous avons été conduit à reprendre cette question. La confrontation des résultats obtenus, en faisant usage de divers déprotéinants et de méthodes différentes pour l'évaluation des glucides, nous a permis de constater des divergences dont nous avons recherché la cause. Ceci nous a amené à mettre en évidence, dans le lait de Femme, la présence d'un glucide complexe, non encore signalé, dont nous avons entrepris l'étude.

De telles recherches nous ont placé le plus souvent dans l'obligation de mettre au point les procédés nécessaires à leur réalisation. Ces recherches purement techniques, la mise en évidence de ce complexe, l'étude de sa composition constituent la partie expérimentale de notre travail. Elle est précédée par une mise au point de diverses questions se rapportant à la composition des divers laits, aux glucides du lait, à la formation du lactose et à la sécrétion lactée, autant de questions qui ne sont ni longuement traitées, ni réunies dans les livres classiques.

Grâce à la complaisance du Professeur Guérin de Montgareuil-Valmale, nous avons trouvé à son service obstétrical tout le matériel de base qui nous était nécessaire.

Nos premiers pas dans le domaine de la chimie ont été guidés par M. le Professeur Roche qui nous a initié à la pratique des microdosages. Il nous plaira toujours d'évoquer le souvenir des deux années passées dans le laboratoire de ce Maître qui joint à une grande érudition le dynamisme souriant d'un jeune chef d'équipe. Nous le prions d'agréer l'expression de notre profonde gratitude.

L'idée première de ce travail était de le limiter à une étude comparative de diverses méthodes de déprotéination et de dosages ; des surprises expérimentales nous ont conduit à pousser plus avant ces recherches. Elles ont été faites au laboratoire de Physiologie Générale de la Faculté des Sciences. Au cours de ce long travail, nous avons constamment trouvé les encouragements et les conseils éclairés d'un père toujours bienveillant. Qu'il trouve ici un hommage de reconnaissance et de filiale affection.

CHAPITRE I.

Le lait.

I. — GÉNÉRALITÉS SUR SA CONSTITUTION.

Le lait est l'aliment complet, réalisé par la nature qui fournit aux petits des Mammifères ce dont ils ont besoin. Il renferme non seulement des glucides, des protides, des lipides, des sels, mais encore des enzymes, des vitamines, voire même des hormones.

Il faut tout d'abord remarquer que, d'une espèce à l'autre, les valeurs relatives des divers constituants sont sujettes à de fortes variations comme le montre le tableau ci-dessous. C'est ainsi que le lait de Femme, par exemple, d'une part contient 5 à 6 fois moins de protéines que celui de Chienne ou de Lapine et que, d'autre part, il est 5 à 12 fois plus pauvre en lipides que le lait de Dauphin ou de Renne.

Même si l'on considère le lait pour une espèce donnée, il ne faut jamais oublier que le lait est un liquide de l'organisme, comme tel c'est un milieu physiologique en équilibre plus ou moins fuyant laissant entrevoir un jeu d'oscillations, oscillations d'ailleurs faibles et qui ne sauraient être désordonnées. Si l'on constate, par exemple, une augmentation anormale de chlorures, on observera une élévation corrélative de la teneur en lactose, balancement régulier, physiologiquement nécessaire au maintien de l'équilibre isotonique par rapport au sérum sanguin. Dans ces cas la simple détermination de la constante moléculaire simplifiée aurait donné un chiffre normal

« Le lait, écrivait Adam, est un mélange bien complexe. Il « n'a pas la simplicité d'un mélange chimique, mais sa com- « position n'est pas facultative comme celle d'un mélange chi-

« mique. Tout se tient en lui et l'ensemble, si divers d'appa-
« rence, doit répondre, par exemple, à des conditions très pré-
« cises de concentration moléculaire. Les rapports entre les
« différentes parties sont réglés avec une telle rigueur et, en
« même temps, une telle délicatesse, que la moindre variation
« de l'une d'elles en entraîne nécessairement d'autres dans
« l'ensemble ».

TABLEAU I. — *Composition du lait chez les diverses espèces animales.*

(en g. pour 1000 cm^3 de lait).

Espèce animale	Glucides (exprimés en lactose)	Matières protéiques	Graisses	Cendres	Eau
Eléphant	73-88	31	196	5	—
Femme	65-70	15- 18	34	2-3	905
Anesse	60-65	19- 22	10- 16	5	925
Chamelle	58	—	—	—	—
Jument	57-65	20	12	4	925
Lama	56	—	—	—	—
Vache	47-52	30- 35	35- 40	7 - 9,5	900
Buflesse	45-50	40- 45	70- 75	9,5-10	850
Brebis	45-50	49- 60	69	10-12	860
Truie	40-55	52- 80	60- 70	10-13	850
Hippopotame	44	—	—	—	—
Chèvre	36-45	37- 39	43	8-10	900
Chatte	34-50	70- 92	40- 45	12-13	830
Chienne	32	74-100	116- 90	13-14	800
Cochon d'Inde	30-40	—	—	—	—
Renne	22-30	98-100	160-200	17-18	675
Lapine	18	104	—	25	—
Marsouin	15	120	450	7-8	425
Dauphin (globiocephalus) melas	—	—	438	—	—
Baleine	—	95	194	10	—

Chiffres empruntés aux ouvrages de KÖNIG (Chem. Zusammensetzung d. Mensch. Nahrungs u. Genussmittel), de GRIMMER (Chem. u. Physiol. d. Milch), ainsi qu'à de nombreux travaux originaux de STORCH, SCHEIBE, PURDIE, WHITTIER, BOSWORTH, VAN SLYKE, ELLENBERGER.

Toutefois certains auteurs, tel DUCLAUX, ne considérant que les variations dans la composition chimique, ont pu écrire il n'y a pas « un lait, mais des laits ». A bien examiner les choses le lait, émanation d'une cellule vivante qui donne une partie de sa substance pour parfaire sa sécrétion, est cependant bien une entité physiologique et, de ce fait, la cellule

mammaire possède une autonomie propre et une physionomie bien tranchée au point de vue fonctionnel. Remarquons du reste que les mêmes conditions physiologiques n'ont pas toujours été observées par les analystes, de plus ceux-ci n'ont pas toujours utilisé des techniques impeccables d'où un flottement dans les résultats qui ne traduit pas la réalité.

Aux dépens des principes que lui apporte le sang artériel, la glande mammaire construit, par son activité propre, les édifices chimiques si caractéristiques du lait : caséine, lactalbumine pour les protéines, certains lipides, lactose pour les glucides, acide citrique, etc.

Les caséines des différents laits répondent à des réactions chimiques et biochimiques comparables, ce qui autorise à dire que la caséine est bien un type chimique ; néanmoins chaque caséine est particulière à l'espèce.

Les lipides du lait se caractérisent par une teneur élevée, une grande variété et une constitution particulière.

Si le lactose est le même dans tous les laits, il semble toutefois accompagné d'autres glucides spécifiques qui varient peut-être selon les espèces.

C'est également la glande mammaire elle-même qui produit les phosphatides du lait, tout au moins en grande partie, ainsi que l'ont montré les recherches entreprises par Hevesy et ses élèves au moyen de l'isotope du phosphore ($_{32}P$). A un moment donné, la glande mammaire transforme en composés phosphoriques du lait ses réserves phosphoriques pour les rétablir ensuite selon le débit.

Pour donner une image plus complète du lait, n'oublions pas que celui-ci renferme trois catégories de substances dont la façon de se comporter vis à vis de l'eau est très différente : des cristalloïdes, qui sont réellement dissous dans l'eau du lait ; des protides (caséine, lactalbumine, lactoglobuline) en pseudosolution colloïdale présentant à l'ultramicroscope des grains de dimensions variables ; enfin des lipides insolubles se trouvant à l'état d'émulsion sous forme de globules très fins (2 à 6 milliards par cm^3).

On sait que la réaction du sang, faiblement alcaline (pH = 7,2), se retrouve dans presque tous les liquides de l'organisme. Le lait s'en écarte un peu, celui de la Femme et de l'Anesse dans le sens de l'alcalinité (pH = 7,6 à pH = 7,8), celui de la Vache et de la Chèvre dans le sens de l'acidité (pH = 7,0 à pH = 6,7).

Tout cet ensemble contribue à donner au lait une stabilité précaire et une physionomie très particulière.

II. — LES COMPOSANTS DU LAIT.

Peut-on établir une « statique » du lait ? Certains, uniquement chimistes, oubliant l'origine du lait, ont une inclination marquée à ne voir dans ce liquide qu'un mélange chimique sujet à de faibles changements de composition. D'autres, s'appuyant sur une physiologie de fantaisie, considèrent certains écarts dans la composition comme normaux et leur fournissent une genèse à laquelle il est difficile d'assurer une vérification expérimentale.

La vérité n'est ni dans l'une ni dans l'autre de ces deux conceptions trop simplistes et, par suite, incomplètes ; les variations de la composition chimique doivent être recherchées dans des causes essentiellement physiologiques. Ces variations, du reste, ne sauraient être quelconques, elles oscillent autour d'une position moyenne et, pour certains composants, l'amplitude de ces oscillations peut augmenter chez divers sujets avec l'âge du lait, l'alimentation de la nourrice, etc. C'est ce qui explique les discordances entre les chiffres indiqués par les auteurs. Il est donc illogique d'en donner une composition fixe, et l'on ne saurait parler de soi-disant « constantes » pour le lait.

Parmi les constituants du lait, nous trouvons des éléments minéraux et des éléments organiques. Faisons toutefois remarquer que, lorsqu'on analyse un lait de Femme, on n'arrive jamais, en additionnant les résultats des différents éléments, à retrouver le poids du résidu sec. Il existe un « non dosé » appréciable, voisin de 5 g. par litre et pouvant atteindre jusqu'à 10 g. (Guiraud [60]).

A. — Matières minérales.

Ces éléments se rencontrent dans le lait de Femme soit à l'état de liberté, soit engagés dans une combinaison organique complexe, soit enfin comme partie intégrante de certains édifices moléculaires (S de la cystine par exemple).

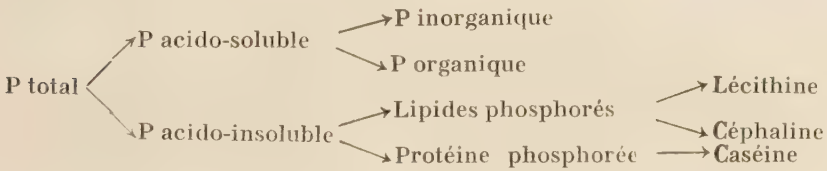
Voici, dans un ordre décroissant, les éléments métalliques les plus abondants dans les matières salines du lait de Femme

et du lait de vache : K, Ca, Na, puis, en quantité moindre, Mg; Fe (Edelstein et Czonka, Lesné, Clément et Zinine), Cu (Hess, Supplee et Bellis), Zn (Sato et Murata) y existent à doses très faibles, Mn (Sato et Murata) à doses plus faibles encore. On a signalé aussi des traces d'Al, de Si, Li et Pb.

La masse métalloïdique la plus importante est fournie par Cl, P, S ; F, Br (Liepert), I (Maurer et Diesz) sont également présents, mais en quantités infinitésimales.

Phosphore. — La teneur en P total du lait humain, exprimée en P_2O_5, varie, selon les auteurs, de 0,325 g. p. 1000 (Lenstrup) à 0,41 g. p. 1000 (Widdows, Lowenfeld, Bond et Taylor) ou 0,47 g. p. 1000 (Bunge). (Ce qui, calculé en P, correspond respectivement à 0,142, 0,18, 0,205 g. p 1000).

Le phosphore, d'après Lenstrup [91], se rencontre dans le lait sous les formes suivantes :



La fraction acido-soluble du lait de Femme comprendrait 50 p. 100 sous forme d'acide phosphoglycérique ou glycérophosphorique (nous envisagerons plus loin qu'une partie du phosphore peut être engagée dans le lait de Femme sous forme d'ester phosphorique). L'autre moitié de ce phosphore existerait d'autre part sous forme inorganique. On connaît le rôle de tampon joué par les divers phosphates.

Le lait de Vache renferme par litre de 0,900 à 1 g. de P total ; le taux du P inorganique acido-soluble atteint près de 65 p. 100. Le P acido-insoluble provient surtout de la caséine.

Comparant le lait humain au lait de Vache, au point de vue de la teneur en phosphore, Lenstrup note qu'un litre du premier contient environ 6,5 fois plus de P total ou de P acido-soluble ou de P acido-insoluble que le second, mais 13 fois moins environ de P inorganique et près de 2 fois moins de P acido-soluble organique.

Calcium. — Dans le lait humain, les proportions de chaux et d'acide phosphorique évoluent parallèlement ; elles atteignent un maximum vers la fin du 2^e mois, puis déclinent ensuite lentement jusqu'à la fin du 10^e mois qui suit la naissance de l'enfant.

La quantité de calcium renfermée dans le lait de Vache varie de 0,85 à 1,65 g. p. 1000 (Bunge ; Pages ; Van Slyke et Bosworth), dans tous les cas elle est très nettement supérieure à la teneur en calcium du lait de Femme qui (exprimée également en Ca) n'est que de 0,23 à 0,45 g. p. 1000 (Bunge ; Schall ; Widdows, Lowenfeld, Bond et Taylor)

Rapport : Ca/P. — On sait toute l'importance, au point de vue alimentaire, du rapport : Ca/P. Ce rapport est, en moyenne, de 1,40 pour le lait de Vache, 1,60 pour le lait de Chèvre et 1,70 pour le lait de Brebis.

Pour le lait de Femme, qui nous intéresse plus particulièrement, les valeurs de ce rapport diffèrent selon les auteurs cités.

Voici des chiffres plus récents dus à Widdows, Lowenfeld, Bond et Taylor [**157**] :

Période de lactation	CaO/P_2O_5	Ca/P
—	—	—
1re - 2e semaine	1,35	2,2
1 mois	1,34	2,18
2e - 4e mois	1,42	2,3
5e - 10e mois	1,25	2,02

B. — Matières organiques.

Les protides. — Dans le lait de Femme et dans le lait de Vache on trouve des substances protéiques ayant chacune leur individualité : un phosphoprotéide : la caséine, une albumine : la lactalbumine, une globuline : la lactoglobuline.

La caséine, produit spécifique de la sécrétion mammaire est prépondérante : elle constitue 75 à 85 p. 100 de l'ensemble protéique et 85 à 90 p. 100 de l'azote total dans le lait de Vache ; 50 à 60 p. 100 des protéines, soit 45 à 55 p. 100 de l'azote total, dans le lait de Femme.

La valeur du rapport : caséine/lactalbumine + lactoglobuline permet de classer les laits : en *laits caséineux* dont le type est le lait de Vache et en *laits albumineux* dont le type est le lait de Femme. Ce rapport présente, pour le lait de Femme, les valeurs suivantes : 1/1 (Stohmann, Porcher), 2,1/1 (Bouchara) et 2,4/1 (Lehmann). Ce même rapport, pour le lait de Vache, varie d'un lait à l'autre : 5,6/1 (Porcher), 6/1 (Stohmann), 10/1 (Lehmann) et même 12,8/1 (Bouchara) ; la valeur moyenne généralement admise est comprise entre 8/1 et 9/1 (Bouchara [**23**]).

Des différences profondes existent dans la composition des protéines entre le lait de Femme et le lait de Vache. Ainsi la lactalbumine représente le 1/3 environ des 14 à 16 g. de protéines que renferme le lait de Femme, alors que, dans le lait de Vache, on ne trouve guère que 1 g. de lactalbumine pour 7 g. de caséine. Or la lactalbumine est beaucoup plus riche en lysine (8,1 p. 100), en tryptophane (2,8 p. 100) et en cystine (4,08 p. 100) que la caséine. Elle renferme toutefois moins de méthionine (2,6 p. 100).

La caséine du lait de Femme et la caséine du lait de Vache, ainsi que le montrent les tests de précipitines, sont 2 protéines spécifiques. Le groupement prosthétique de la caséine serait constitué par l'enchaînement de plusieurs molécules d'acide sérine-phosphorique (Posternak).

D'après Bosworth [20], les caséines du lait de Vache et du lait de Femme, au point de vue de leur teneur en soufre, phosphore et azote, sont donc très voisines, mais diffèrent l'une de l'autre par leurs propriétés physicochimiques. Elles se comportent différemment vis à vis des acides, des sels neutres à saturation et enfin des enzymes. On a signalé, depuis très longtemps, la façon bien différente dont s'opère la coagulation dans l'estomac selon l'origine du lait : le lait de Femme se « caille » en grumeaux fins et légers, alors que le lait de Vache fournit, dans les mêmes conditions, des caillots volumineux et compacts. On conçoit toute l'importance de ce fait au point de vue de l'alimentation enfantine.

Les lipides. — Quand on abandonne au repos le lait, qui est une émulsion de globules gras dans le lactoplasma, cette émulsion se détruit et la « crème » se forme par la réunion de globules graisseux que leur faible densité amène à la surface du liquide. Un examen comparatif du lait de Femme et du lait de Vache montre que les lipides n'y présentent ni la même teneur, ni la même composition. Le lait de Vache renferme la série complète des acides gras d'atomicité paire, depuis l'acide butyrique en C_4 jusqu'à l'acide arachidique en C_{20}, l'acide béhénique en C_{22} ($C_{22}H_{44}O_2$) et un acide en C_{26} (cérotique) à l'exclusion de toute quantité appréciable d'acides gras d'atomicité impaire. Les acides gras (de C_4 jusqu'à C_{14}) forment 20 p. 100 seulement du total. Ces acides gras à chaîne courte, qui n'apparaissent pas dans le sang en quantités décelables, semblent formés dans les cellules de la glande mam-

maire par oxydation dégradante d'acides gras à chaîne plus longue (Hilditch et Paul [68]).

Les travaux de Bosworth et Brown [21], Eckstein, ont montré que l'on peut rencontrer dans la graisse du beurre (Vache), en dehors de l'acide oléique qui entre dans la composition de ce beurre à raison de 30 p. 100, des acides gras non saturés : en C_{10} (acide décénoïque), en C_{14} (acide tétradécénoïque), en C_{20} (acide gadoléique) ; des acides en C_{18} (acide linoléique), C_{22} et C_{24} avec 2 doubles liaisons ; enfin des acides à 3 doubles liaisons (acide linolénique) et même un acide fortement insaturé en C_{22} à 4 doubles liaisons du type $C_nH_{2n-8}O_2$, homologue supérieur de l'acide arachidonique. Le beurre de Vache renferme environ 72 p. 100 d'acides saturés et 41,5 p. 100 de glycérides entièrement saturés (Hilditch et Sleightholme [69]).

Dans le *beurre humain*, Bosworth [22] a décelé la présence des acides tétradécénoïque, hexadécénoïque, oléique et linoléique. En outre, d'autres acides non saturés dont 2 au moins du type arachidonique s'y trouveraient également.

Le beurre de Femme qui est très riche en acide oléique : 52 g. p. 100, renferme seulement, d'après Polonovski, Cuvelier et Avenard [123] 0,35 p. 100 d'acide butyrique ce qui fait de ce lipide plus une « margarine » qu'un « beurre ».

Lipides complexes. — Dans le lait nous trouvons des glycérophosphoaminolipides dans lesquels les acides gras sont combinés à l'acide glycérophosphorique sous forme d'esters : des céphalines qui renferment des acides gras (stéarique, oléique, linoléique) unis à la colamine ou aminoéthanol, des lécithines constituées par des esters de l'acide glycérophosphorique α ou β et de choline (remplaçant la colamine).

Stérides — Ce sont des lipides dans lesquels l'alcool est un stérol. Le cholestérol se trouve sous forme d'ester stéarique, palmitique et oléique, dans le lait humain où la quantité présente varie grandement avec la teneur en matière grasse du lait, les individus, et même la phase de la tétée. Les divers auteurs s'accordent pour placer le taux moyen du cholestérol aux environs de 0,20 g. pour le lait de Femme et de 0,15 g. à 0,40 g. pour le lait de Vache.

Parmi les divers constituants du lait ce sont les matières grasses qui sont peut-être les plus sensibles aux variations. Ainsi, d'après Smith [142], le jeûne apporte un changement

considérable dans la graisse du lait de Vache, principalement une diminution de 80 p. 100 du contenu originel des acides gras inférieurs à C_{14}, y compris ce dernier. Cette déficience est à peu près compensée par une augmentation de l'acide oléique qui tend à remplacer les composés inférieurs.

Acide citrique. — Parmi les constituants spécifiques du lait, on peut ranger l'acide citrique. Toutefois sa présence a été signalée dans d'autres sécrétions par Cattelin (1931). Le lait de Femme serait beaucoup moins riche en acide citrique que le lait de Vache : 0,78 g. par litre dans le premier contre 2 g. à 2,10 g. dans le second (Desmoulières).

Les glucides. — Les glucides du lait sont constitués surtout par du lactose. Nous y reviendrons dans un chapitre spécial. Signalons seulement maintenant qu'à côté du lactose se trouvent d'autres sucres et que la caséine et la lactalbumine renferment non du lactose mais de petites quantités de galactose (0,31 p. 100 dans la caséine ; 0,44 p. 100 dans la lactalbumine, Sörensen et Haugaard).

Les vitamines. — Les variations de composition du lait portent très nettement sur le beurre, mais on peut constater également une influence saisonnière au point de vue de la teneur en vitamines, vitamines liposolubles plus particulièrement, le fait est moins net pour les vitamines hydrosolubles. Les vitamines, rencontrées dans le lait, sont les vitamines : A, B_1, B_2, C et D, on a établi leurs dosages et suivi leurs variations. On a mis aussi en évidence l'existence de caroténoïdes. Le colostrum humain renferme trois fois plus de vitamine A, de vitamine C et de caroténoïdes que le lait des premiers jours.

Vitamine A. — La vitamine A été dosée dans le lait de Femme par Neuweiler (1936), puis par Chevallier, Giraud et Dinard (1939). Les résultats de ces divers auteurs, obtenus avec des méthodes différentes, ne sont pas concordants.

Vitamines du groupe B. — 1° Vitamine B_1 : les dosages de la vitamine B_1, dans le lait, ne sont pas très nombreux : Donelson et Macy (1934), Randoin (1937), Widenbauer et Heckler (1939).

2° Vitamine B_2 : la teneur en vitamine B_2 du lait humain a été déterminée par Donelson et Macy, Neuweiler, L. Randoin et Raffy. La flavine est à l'état fluorescent dans le lait

de Vache et à l'état de pigment jaune non fluorescent dans le lait humain (Koschara).

L'Eléphant a dans son lait la même teneur en riboflavine que la Vache (Markuze). Le lait de Cobaye est pauvre (85 γ par 100 cm³) et le lait de Rate beaucoup plus riche (400 à 800 γ par 100 cm³) [Houston et Kon (1939)].

Vitamine C. — L'étude de la vitamine C dans le lait de Femme a, par contre, fait l'objet de très nombreuses recherches. Les chiffres extrêmes sont les suivants : 2 mg. (Meunier et Mentzer) à 5 mg. (Harris et Ray) et 6 mg. (Neuweiler) pour 100 cm³ de lait.

Vitamine D. — Bien peu de travaux viennent confirmer les premiers chiffres obtenus. Sabri et Fikry (1932) estiment à 0,0001 mg. en moyenne par 100 cm³ la quantité de vitamine D renfermée dans le lait de Femme.

Chez les Vaches, le lait d'été est deux fois plus riche en vitamine D que le lait d'hiver. Cet enrichissement du lait est dû à l'exposition des Vaches au soleil et non, comme on l'avait cru longtemps, au fait qu'elles mangent de l'herbe fraîche.

Des expériences ont été réalisées au « Research Institute at Reading » en vue d'augmenter la teneur en vitamine D du lait par l'ingestion d'aliments riches en cette vitamine : huile de foie de morue, levure irradiée, cosses de cacao, etc. On a pu ainsi arriver à égaliser les teneurs en vitamine D du lait et du beurre d'hiver à celles du lait et du beurre d'été. Alors que l'ingestion d'huile de foie de morue est accompagnée d'une diminution du pourcentage de crème dans le lait, la levure irradiée n'avait aucun effet et la cosse de cacao au contraire produisait une légère augmentation du pourcentage de matières grasses. Ces effets ne semblent donc pas dûs à la consommation de vitamine D mais à d'autres causes. Voici quelques valeurs expérimentales :

Teneur en vitamines (en mg. p. 100 g. de lait)	Lait de Femme	Lait de Vache
A	0,050	0,002 à 0,090
B_1	0,015 à 0,020	0,060
B_2	0,035	0,100
C	4 à 4,5	0,1 à 2,5
D (*)	0,001	0,00007 Lait d'hiver 0,0001 Lait d'été

(*) 0,000025 mg. correspondent à 1 unité internationale de calciférol.

En résumé : le lait de Femme est plus pauvre que le lait de Vache : en lipides, en protides, S, P, Cl et éléments minéraux proprement dits tels Na, K, Mg, Ca, en vitamines B_1, B_2. Il est, par contre, beaucoup plus riche en glucides, en vitamines A, C, et en caroténoïdes.

Pour le lait de Femme, on peut établir les rapports suivants :

Ca/Mg = 7,5 ; Ca/Fe = 60 ; Ca $\times$ 10^3/protides = 21,4.
Vitamines B_1 $\times$ 10^6/glucides = 2,3 ; protides/glucides = 0,20.

Le rapport : protides + lipides/glucides est de 1/1,20 pour le lait de Femme et de 1/0,54 pour le lait de Vache.

Ce dernier demeure donc, s'il n'est corrigé, un aliment fortement déséquilibré pour l'enfant, il est d'ailleurs destiné à un organisme dont la croissance est 4 fois plus rapide.

D'après ces rapports et le tableau I, on voit que la différenciation des laits est surtout d'ordre quantitatif.

Pour Bunge, il y aurait adaptation de la sécrétion lactée aux besoins de chaque espèce animale. On prévoit, dès lors, qu'un lait doit être d'autant plus riche en protéines et sels minéraux, matériaux nécessaires à l'édification des tissus, que l'organisme à satisfaire augmente plus rapidement de poids. Par suite s'explique toute la différence entre le lait de Femme destiné à un nouveau-né qui ne doublera son poids qu'en 180 jours et le lait de Lapine, par exemple, qui doit assurer la croissance d'un petit doublant son poids en 6 jours seulement (tableau II).

D'autre part, le lait est produit par la femelle en vue de la nourriture du nouveau-né pour lequel il constitue un aliment indispensable. Mais cette absolue nécessité du lait présente bien des degrés : tout à fait marquée pour le jeune qui vient à la vie, nu et incapable de se mouvoir, elle l'est beaucoup moins pour celui qui naît couvert, mobile et susceptible de prendre très vite un aliment autre que le lait de la mère. Il semble que plus la vie intra-utérine est longue, et c'est surtout frappant si la taille de l'espèce est petite, plus la sécrétion lactée se montre courte. La différence à ce sujet est très sensible entre le jeune Cobaye, capable de s'alimenter comme la mère dès la naissance, et le jeune Lapin.

Que dire de l'enfant ? Longtemps encore après sa naissance l'alimentation lactée exclusive lui est indispensable, ce qui rend son existence précaire et tributaire de son entourage à tel point que l'on a pu dire non sans humour : « De toutes

les professions dangereuses, la plus incertaine est celle du nouveau-né ».

TABLEAU II. — *Durée de la lactation dans diverses espèces et données sur la durée de la gestation et sur le développement corporel.*

	Durée de la gestation	Age de la puberté	Durée moyenne de la vie	Durée de la lactation	Temps que met le nouveau-né pour doubler son poids
Femme.....	9 mois	13 à 15 ans	45 à 50 ans	12 mois	180 jours
Anesse	1 an	18 mois à 2 ans	20 à 25 ans	5 mois	—
Jument.....	11 mois	18 mois à 2 ans	20 à 25 ans	5 mois	60 jours
Vache.....	9 mois 1/2	15 à 18 mois	15 à 20 ans	4 à 4 mois 1 2	47 jours
Brebis	5 mois	8 à 10 mois	10 ans	2 à 2 mois 1/2	15 jours
Chèvre.....	5 mois	8 à 10 mois	10 ans	2 à 2 mois 1/2	22 jours
Truie.....	4 mois	6 mois	10 ans	6 semaines	14 jours
Chienne.....	63 à 65 j.	5 à 7 mois	10 ans	30 à 40 jours	9 jours
Chatte	55 à 56 j.	5 mois	10 ans	30 à 40 jours	9 jours 1/2
Lapine.....	30 j.	3 mois 1/2	—	4 semaines	6 jours
Cobaye.....	60 à 65 j	2 mois	—	quelque jours	—

Si on compare la période de l'alimentation lactée exclusive à la durée moyenne de l'existence, on voit que, pour l'espèce humaine, elle est relativement beaucoup plus longue que pour les autres espèces. Le tableau II qui indique les chiffres relatifs à la durée de la gestation de la mère, à la durée de l'alimentation exclusivement lactée du jeune, à la durée moyenne de vie de l'adulte est particulièrement suggestif à cet égard.

En définitive, si la différence est surtout d'ordre quantitatif, certaines données d'ordre qualitatif ont une grande importance, comme en rend compte l'examen du tableau III. On peut essayer par divers moyens de rapprocher le lait de Vache du lait de Femme de façon à ne plus avoir de différences essentielles à l'analyse, mais on aura beau « humaniser », « materniser » un lait de Vache, on ne saurait en faire un lait de Femme. Le lait soumis aux lois de l'organisme qui l'a formé, a une origine physiologique qui lui donne sa complexité et lui impose en même temps une harmonie qui manque dans les mixtures artificielles. « Les chimistes, malgré toute leur habileté, ne sauront jamais toucher à cet ensemble harmonieux sans rompre l'équilibre parfait établi par la nature ».

TABLEAU III. — *Composition moyenne comparée du lait de Femme et du lait de Vache* (exprimée en g. pour 1000 cm³ de lait).

				Lait de Femme	Lait de Vache
Densité				1.031	1.033
Eau				900 - 910	905 - 910
Extrait sec				120 - 132	125 - 130
Lipides totaux				25 - 35	37
	Lipides complexes (lécithine)			1,60 - 1,68	1
	Stérides (esters de cholestérol)			0,16 - 0,24	0,15 - 0,40
	Lipides simples				
Matières azotées	Protides totaux			14 à 16	30 - 35
	Protides	Caséine		6 - 10	25 - 30
		Lactalbumine		3 - 5	4 - 5
		Lactoglobuline		2 - 3	1,50 - 2,50
		Groupe uréique : urée		0,50	0,25
	Non protidiques (environ 1 g.)	Groupe purique	acide urique		0,017
			adénine		
			guanine		
		Groupe guanidique	créatine	0,00173 à 0,00271	0,012 - 0,025
			créatinine	0,00078 à 0,00131	
Lactose anhydre				68 - 72	40 - 45
Acide citrique				0,78 - 1,20	1,50 - 2
Cendres brutes				2 - 2,5	7
	S			0,128 - 0,180	0,325 - 0,400
	P			0,180 - 0,205	1.97
	Cl			0,400 - 0,600	1,70
	Na			0,300	1,11
	K			0,450 - 0,850	1,27 - 1,70
	Mg			0,040	0,21
	Ca			0,250 - 0,400	1,60
	Fe			0,005	0,004
	Cu			0,0008	—
	Zn			0,0075	2 - 18
	Mn			0,00003	traces
	I			(indosable)	(indosable)

CHAPITRE II.

Les glucides du lait.

Le lait des Mammifères renferme en assez grande abondance un glucide qu'on a facilement extrait à l'état cristallisé et désigné sous le nom de sucre de lait ou lactose.

Ritthausen [130], dès 1877, signale dans le lait, à côté du lactose, la présence en petites quantités d'un autre hydrate de carbone. A leur tour, Schmöger [135], Landwehr [90] étudient ce composé. Ce dernier paraît répondre à la formule $C_{12}H_{20}O_{10}$ et doit être considéré comme une « gomme animale ». Les auteurs précités attribuent à la coexistence de cette gomme et du lactose les anomalies constatées dans certains laits entre les dosages au polarimètre et à la liqueur cupropotassique. L'existence de cette substance sera envisagée plus loin.

En 1880, Esbach [38] annonce que le lait ne contient pas un seul et unique lactose, mais qu'il existe dans chaque lait un mélange de lactoses à propriétés très différentes suivant les espèces animales considérées. Béchamp conclut également de ses recherches que le sucre présent dans le lait de Femme offre des propriétés spéciales. Enfin Pappel et Richmond [112] retirent du lait de Bufflesse un sucre qu'ils différencient du lactose et nomment le X-tewfikose. Mais G. Denigès (1892) [35] démontre la parfaite identité des lactoses retirés par cristallisation des laits de Femme, Anesse, Jument, Vache, Brebis. Cette identité n'est pas le fait de l'obtention des sucres à l'état cristallisé, elle se retrouve dans les laits eux-mêmes. Le X-tewfikose de Pappel et Richmond ne saurait non plus être distingué du lactose ordinaire (Porcher [127]).

Enfin, d'après G. Denigès, dans les laits de Femme, d'Anesse, de Jument et probablement de Chienne, le lactose serait ac-

compagné d'une substance active sur le plan de la lumière polarisée : lévogyre dans les laits de Femme et de Chienne, dextrogyre dans les autres laits. Le corps lévogyre est à la dose de 5 g. par litre pour le lait de Femme, et le corps dextrogyre à la dose probable de 2 g. pour le lait d'Anesse.

Ces substances douées de pouvoir rotatoire, ne réduisent pas la liqueur cupropotassique ; elles ne sont pas précipitables par les réactifs de désalbumination (sels de Pb, de Hg, etc), elles ne paraissent pas renfermer d'azote.

Nous allons passer en revue les différents glucides que le lait peut renfermer.

A. — *LACTOSE.*

I. — Généralités.

Le lactose se rencontre presque exclusivement dans le lait des Mammifères. La seule observation sur la présence du lactose dans le règne végétal est due à G. Bouchardat [24] qui l'a signalé dans le suc du sapotillier (*Achras sapota*), bel arbre des Antilles (*).

Pour la première fois en Europe, il est fait mention du sucre de lait par Bartholetti, de Bologne, dant son *Encyclopedia dogmatica* (1615), sous le nom de « manna seu nitrum seri lactis », mais ce glucide était déjà connu des alchimistes et des Asiatiques. Les Tatars, en effet, faisaient usage depuis très longtemps d'une matière sucrée qu'ils tiraient, par congélation, du lait de leurs cavales.

Nous avons déjà signalé que le lactose existe en plus ou moins grande abondance (de 1,5 à 8 p. 100) dans le lait de tous les Mammifères.

La constitution du lactose n'a été établie qu'à la suite de très nombreuses recherches. C'est tout d'abord Bouchardat, Vogel qui maintiennent que le sucre de lait donne naissance par hydrolyse à un sucre fermentescible dont Pasteur retire

(*) Dans la cordillière des Andes on trouve un « arbre à lait » ou « arbre à vache » (*Brosimum galactodendron*, de la famille des Artocarpées qui fournit déjà l'arbre à pain) ainsi nommé parce que les incisions du tronc laissent échapper un liquide laiteux ayant le goût du lait de vache. Ce lait végétal dont se nourrissent certains indiens de l'Amérique du Sud a été analysé par Boussingault, il renferme des substances sucrées (2,8 p. 100), de la caséine et de l'albumine (1,7 p. 100), des phosphates alcalins et terreux (0,5 p. 100), etc.

le galactose ; puis Fudakowski établit que le produit d'hydratation du lactose est constitué par deux sucres réducteurs dont l'un, d'après G. Bouchardat, est bien le galactose de Pasteur, et l'autre un sucre voisin du glucose ordinaire. Enfin Kent et Tollens [85] confirment ces résultats et identifient les deux sucres résultant de l'hydrolyse du lactose, l'un au galactose, l'autre au glucose.

Raoult, Brown et Morris, C. Tanret ont trouvé par la cryoscopie que le poids moléculaire du sucre de lait correspond à $C_{12}H_{22}O_{11}$, contrairement à l'opinion de Tollens qui proposait $C_{24}H_{44}O_{22}$, $2\,H_2O$ (formule du lactose doublée). C'est donc bien un diholoside.

Le lactose est réducteur et présente le phénomène de la mutarotation. C. Tanret [148] a montré que ces modifications du lactose ont un pouvoir rotatoire différent de celui du sucre primitif et répondent aux lactoses α et β.

En évaporant le petit lait, après coagulation de la caséine, on sépare facilement le lactose sous forme de très beaux cristaux qui sont l'hydrate de la forme α ; la forme β s'obtient par cristallisation à chaud (C. Tanret, Hudson, Hudson et Brown, Gillis).

Le lactose existe habituellement sous la forme hydratée, et ne perd sa molécule d'eau qu'au-dessus de 125°. Le pouvoir rotatoire de cet hydrate a été déterminé par Smöger, Esbach, Parkus et Tollens, Denigès et Bonnans. D'après ces derniers le pouvoir rotatoire du lactose hydraté serait donné pour toutes les températures par la formule suivante :

$$[\alpha]_D = + 52°53 + 0{,}055\ (20 - t°)$$

Smöger a reconnu que $[\alpha]_D$ est indépendant de la concentration et diminue ou s'élève de 0°055 pour chaque degré de température, le pouvoir rotatoire du lactose hydraté étant d'après lui : + 53°5 à 10°, + 53°46 à 14°, et 52°63 à 20°.

C. Tanret a confirmé les résultats de Smöger ; voici les pouvoirs rotatoires que cet auteur donne pour les sucres très purs préparés par lui : $[\alpha]_D^{15°} = + 56°$ pour le lactose anhydre et + 53°02 pour le sucre hydraté (à la même température de + 15°). Denigès et Bonnans indiquent un chiffre plus faible + 54°7 à + 18° ou + 20 °.

Grâce à sa fonction aldéhydique, le lactose peut se combiner à la phénylhydrazine. La lactosazone se présente sous forme d'aiguilles groupées en oursins. Elle est soluble à chaud dans

l'eau, et, à froid, dans l'acétone étendue de son volume d'eau. Nous aurons à revenir sur ses propriétés.

Sous l'influence d'enzymes (lactases) le lactose est dédoublé en glucose et galactose. La lactase, chez les Mammifères, est localisée dans les cellules de l'intestin ; le suc intestinal n'en renferme pas (H. Bierry et A. Frouin). Le lactose n'est utilisé par l'organisme animal que s'il a été préalablement hydrolysé par la lactase.

La levure de bière ne fait pas fermenter directement le lactose, mais seulement après hydrolyse. Un microorganisme, le ferment lactique, transforme le lactose en acide lactique inactif sur la lumière polarisée. Comme ces bactéries existent dans les poussières atmosphériques, il en résulte que le lait abandonné à l'air ou dans un vase non stérilisé, subit bientôt la fermentation lactique.

Si la levure de bière ordinaire, dépourvue de lactase, n'a pas d'action sur le lactose, d'autres levures, renfermant une lactase, font subir au sucre de lait une fermentation à la fois alcoolique et lactique et donnent des boissons connues sous le nom de *Kéfir* (préparé avec le lait de Vache) et *Koumys* (préparé avec le lait de Jument).

II. — Constitution stéréochimique.

Le lactose est un diholoside formé par la condensation de deux oses avec départ d'une molécule d'eau. Comme il est réducteur, la condensation du groupe pseudoaldéhydique de l'un des oses se fait avec l'un des hydroxyles alcooliques de l'autre. Les diholosides de cette sorte existent sous deux formes mutarotatoires, différant seulement par l'arrangement stérique des groupements autour du groupe pseudo-aldéhydique libre. Ces diholosides réduisent la liqueur cuproalcaline, donnent des glucosides, des osazones, en un mot toutes les réactions des oses (aldoses). Ils ont, du reste, certaines analogies avec les glucosides puisqu'ils peuvent être transformés en monoses par hydrolyse à l'aide des acides ou des ferments. Sans entrer dans les détails, il est utile de résumer les recherches qui ont permis d'établir la formule du lactose.

Pour avoir une idée exacte de la structure d'un diholoside réducteur, il faut déterminer : 1° la nature des oses constituants ; 2° l'ose qui porte le groupe réducteur ; 3° la nature de la liaison osidique entre les deux oses (forme α ou β) ;

4° la structure des oses constituants ; 5° la place de la liaison osidique.

1. ***Nature des oses constituants.*** - Sous l'action des acides ou des ferments solubles le lactose est hydrolysé en *d*-glucose et *d*-galactose.

Dans le cas d'un polyholoside l'hydrolyse, ménagée ou forte, peut, dans certains cas, révéler non seulement la nature des restes monosaccharidiques, mais l'ordre dans lequel ils sont liés dans la molécule.

2. ***Détermination de l'ose portant le groupe réducteur.*** — Un certain nombre de réactions ont permis de démontrer que, dans le lactose, le groupe réducteur appartient au glucose.

a. Le lactose donne, par oxydation, l'acide lactobionique qui, soit par les acides (Fischer et Meyer), soit par les enzymes (Bierry et Giaja [11]), peut être hydrolysé en galactose et acide gluconique :

$$\underset{\text{acide lactobionique}}{C_{12}H_{22}O_{12}} \longrightarrow \underset{\text{galactose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{acide gluconique}}{C_6H_{12}O_7}$$

b. Par la synthèse des cyanhydrines le lactose fournit l'acide lactose-carbonique qui est transformé, par hydrolyse, en galactose et acide glucoheptonique (Keinbrecht) :

$$\underset{\text{ac. lactose-carbonique}}{C_{13}H_{24}O_{13}} \longrightarrow \underset{\text{galactose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{ac. glucoheptonique}}{C_7H_{14}O_8}$$

c. Sous l'influence d'HCl fumant, la lactosazone se transforme en lactosone (aldocétose) que les acides étendus et chauds scindent en galactose et glucosone (Fischer). Ceci constitue une preuve indirecte, puisqu'elle exige la préparation de lactosone ; le dédoublement de la lactosazone elle-même par les acides a été tenté sans succès par Fischer. La preuve directe est fournie par la lactase qui hydrolyse, sans transformation préalable, la lactosazone : le galactose seul est mis en liberté, le glucose reste combiné à la glucosazone. C'est donc bien au reste de glucose, dans la lactosazone, qu'est attachée la phénylhydrazine (Bierry et Giaja [11]) :

$$\underset{\text{lactosazone}}{C_{12}H_{20}O_9\ (N_2H\text{-}C_6H_5)_2} \xrightarrow{HCl} \underset{\text{lactosone}}{C_{12}H_{20}O_{11}} \longrightarrow \underset{\text{galactose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{glucosone}}{C_6H_{10}O_6}$$

$$\underset{\text{lactosazone}}{C_{12}H_{20}O_9\ (N_2H\text{-}C_6H_5)_2} \xrightarrow{Lactase} \underset{\text{galactose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{phénylglucosazone}}{C_6H_{10}O_4\ (N_2HC_6H_5)_2}$$

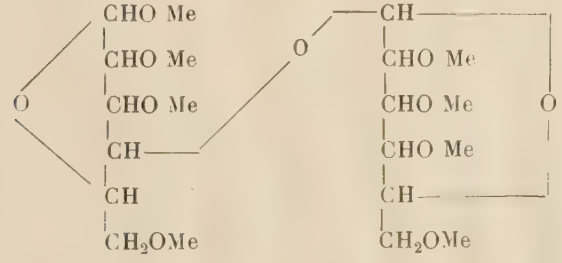
Tous ces faits concourent à montrer que le groupe réducteur (reste de glucose) a été transformé dans toutes ces réactions, tandis que le reste de galactose est demeuré intact, étant protégé par la substitution de son carbone pseudo-aldéhydique. C'est donc bien au reste de glucose qu'appartient le groupe réducteur.

3. ***Nature de la liaison osidique entre les deux oses.*** — La détermination de la liaison osidique du lactose, et des diholosides en général, a été faite depuis longtemps. Elle n'a aucun rapport avec les travaux relatifs à la structure du noyau. Elle est basée sur la nature de la diastase susceptible de provoquer la libération des deux oses du diholoside. L'hydrolyse diastasique se montre, en effet, très sélective et permet certaines affirmations sur la nature stéréo-isomérique des sucres libérés. C'est ainsi que l'émulsine, qui renferme la diastase spécifique des glucosides β (glucosidase β) et des galactosides β (galactosidase β ou lactase), n'attaquent que les combinaisons des glucoses et des galactoses β, alors que la levure de bière desséchée n'attaque que les formes α des mêmes sucres.

Comme le lactose est hydrolysé par l'émulsine on en conclut que l'ose (galactose) dont le groupe réducteur est intéressé dans la liaison osidique est sous la forme β.

4. ***Structure des oses constituants.*** - L'école anglaise (Haworth et ses collaborateurs) a donné la solution du problème, grâce à une méthode utilisant la méthylation qui s'est montrée très féconde. Cette méthode comprend plusieurs temps :

1° Elle débute par une méthylation des groupes OH libres (OH étant transformé en —OCH_3) au moyen d'un procédé mixte (méthode de Haworth, puis méthode de Purdie et Irvine) ; seuls échappent les groupements OH qui ne sont pas libres. Un méthoxy se fixe sur le groupe réducteur pour donner un méthylbioside et 7 autres sur les oxhydryles libres:



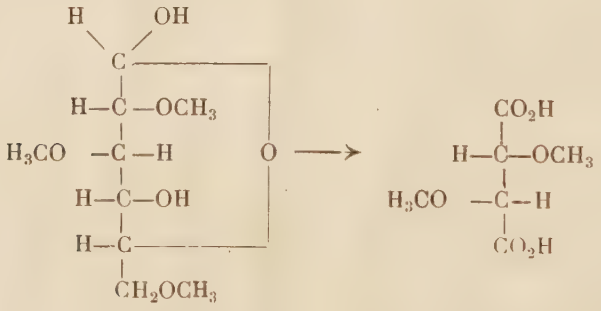
2° Par hydrolyse de cet octométhyllactoside (heptaméthylméthyllactoside) la liaison osidique, située entre les deux oses, est rompue ainsi que celle du méthylbioside et l'on obtient un ose tétraméthylé qui dérive de l'ose dont le groupe réducteur est intéressé dans la liaison osidique et un ose triméthylé :

1. Méthylation : lactose ⟶ heptaméthylméthyl-lactoside.
2. Hydrolyse du méthylbioside ⟶ ose tétraméthylé + ose triméthylé.

a. *Structure de l'ose dont le groupe réducteur forme la liaison osidique.* — L'ose tétraméthylé, obtenu à l'état cristallisé, a été identifié, dans le lactose et aussi dans le mélibiose, avec le tétraméthylgalactopyranose. L'ose (galactose) dont le groupe réducteur est intéressé dans la liaison osidique est donc bien sous forme pyranique.

b. *Structure de l'ose dont le groupe réducteur reste libre.* — L'ose triméthylé a été reconnu comme triméthylglucose, mais 8 isomères peuvent exister : 4 isomères pour le triméthylglucose à noyau pyranique et 4 pour le triméthylglucose à noyau furanique.

Par hydrolyse de l'heptaméthylméthyl-lactoside, on obtient un triméthylglucose qui, par oxydation nitrique, donne l'acide *d*-diméthoxy-succinique. Il est évident que ce triméthylglucose est le 2-3-6 triméthylglucopyranose.



2-3-6 triméthylglucopyranose — acide *d*-diméthoxy-succinique

Le 2-3-6 triméthylglucose possède 2 atomes de carbone non méthoxylés : en (4) et en (5). Le carbone (4) porte un oxhydryle et l'oxhydryle situé en (5) est engagé dans la structure du noyau pyranose.

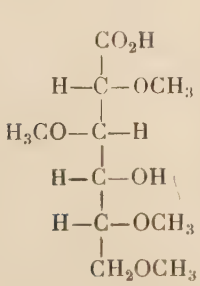
Le noyau du glucose dont le groupe réducteur reste libre

dans le lactose est celui du glucopyranose et la liaison osidique est en (4).

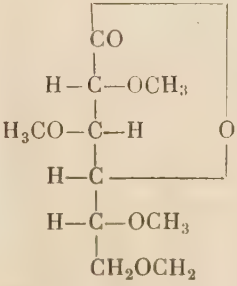
5. ***Place de la liaison osidique.*** — D'après HUDSON, le noyau du glucose dont le groupe réducteur reste libre, était celui du glucofuranose et non celui du glucopyranose et, si l'on trouvait, après hydrolyse, le 2-3-6 triméthylglucopyranose, c'est que l'hydrolyse avait provoqué le « glissement » du noyau de la structure furanique à la structure pyranique.

Cette hypothèse a été ruinée par les expériences d'HAWORTH et ses collaborateurs, grâce à une méthode basée sur la formation d'acides dérivés des bioses réducteurs, par oxydation du groupe réducteur transformé par l'eau de brome en carboxyle. Ces acides, analogues à l'acide gluconique, se forment par ouverture du noyau de l'ose réducteur et, en milieu alcalin, la chaîne reste ouverte. De cette façon l'oxhydryle, intéressé dans la structure du noyau, devient libre et subit la méthylation comme les autres. Par hydrolyse de cet acide méthylé, on obtient un acide gluconique tétraméthylé susceptible de donner une lactone : tétraméthylgluconolactone γ ou δ, suivant la position de la liaison osidique en (4) ou (5).

La lactone obtenue à partir du lactose et aussi du maltose et du cellobiose est la lactone γ.



acide tétraméthylgluconique



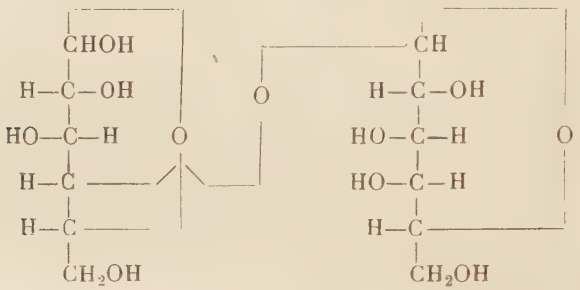
tétraméthylgluconolactone γ en (1-4)

Or cette lactone ne peut se former qu'à partir d'un acide tétraméthylgluconique dans lequel l'oxhydryle en (4) est libre ; et cet OH libre ne peut être que celui qui participait à la liaison osidique. Il n'y a donc pas glissement du noyau et la liaison osidique est bien en (4).

EN RÉSUMÉ : les 2 oses constituants du lactose se trouvent l'un et l'autre sous la forme stable : glucopyranose et galactopyranose.

Le lactose est galactoside de la fonction alcool secondaire du glucose située à l'atome (4). La liaison osidique du lactose est sous forme β, elle appartient à un galactose β. La preuve définitive de la structure du noyau (1-5) et de la liaison osidique en (4) a été fournie par Haworth et Long [64].

La formule suivante permet de se rendre compte de la structure stéréochimique du lactose :



Le lactose est donc le 4 (β *d*-galactosido)-*d*-glucose.

B. — *GYNOLACTOSE.*

Après de longs épuisements du lait par l'alcool suivis de nombreuses cristallisations, Polonovski et Lespagnol montrent que les glucides de ce liquide peuvent être séparés en deux fractions : une fraction peu soluble dans le méthanol et une autre soluble. Ils parviennent à isoler deux nouveaux glucides : le gynolactose et l'allolactose.

Le gynolactose est contenu dans la première fraction [120]. Il se présente sous forme de cristaux blancs, hygroscopiques, fondant vers 205°. Très soluble dans l'eau, il est peu soluble dans l'alcool méthylique et l'acétone à froid ; il se dissout mieux dans le méthanol chaud d'où il cristallise par refroidissement.

Il est lévogyre et réducteur ; son pouvoir réducteur est « égal à un peu moins de la moitié de celui du glucose, soit environ les 2/3 de celui du lactose ».

Dans leurs premières recherches les auteurs avaient obtenu un gynolactose de pouvoir rotatoire spécifique de — 12° et d'un pouvoir réducteur p, tel que $p\left(\frac{\text{Poids du cuivre après hydrolyse}}{\text{Poids du cuivre avant hydrolyse}}\right)$ soit légèrement supérieur à 2. Ils se sont trouvés ensuite dans

l'impossibilité de « recristalliser plusieurs fois un produit de F voisin de 2 ».

Des variations ont été également constatées concernant la valeur du pouvoir rotatoire [122].

C. — *ALLOLACTOSE.*

L'allolactose est aussi un corps cristallisé [124]. Il est très soluble dans l'eau, il se dissout également dans l'alcool méthylique froid, mais il est presque insoluble dans l'acétone et peu soluble dans l'éthanol. Un peu moins réducteur que le lactose, il est aussi moins dextrogyre : $[\alpha]_D = + 25°$. Il donne une osazone, soluble dans l'eau chaude, et cristallisant par refroidissement. Cette osazone s'altère très facilement même à la température ordinaire ; elle fond à 175-177° au bloc Maquenne (fusion instantanée de G. Bertrand). Les solutions d'allolactosazone dans la pyridine sont nettement lévogyres.

L'allolactose est hydrolysable par les acides et l'émulsine : « dans la liqueur d'hydrolyse, écrivent les auteurs, nous avons caractérisé le glucose à l'état de glucosazone et transformé le galactose en acide mucique ».

Polonovski et Lespagnol décrivent ce glucide comme un aldobioside, ils en ont fait d'abord un glucosidogalactose, puis un galactosidoglucose. Pour le prouver, ils ont effectué les 3 réactions suivantes : 1° formation et dédoublement d'acide allolactobionique ; 2° hydrolyse de l'allolactose ; 3° obtention de cyanhydrine.

Le premier procédé, appliqué à un allolactose impur ($[\alpha]_D = + 7$), ne donna pas de résultats satisfaisants. La liqueur provenant de l'hydrolyse de l'acide allolactobionique, obtenu non par oxydation avec le brome, comme dans le procédé classique, mais par l'iode, fournit en petites quantités une osazone qui « présentait au microscope les gerbes de la glucosazone ». C'est à la suite de cette expérience que les auteurs avaient conclu à la nature glucosidique de l'allolactose, mais en multipliant les expériences, ils n'ont plus retrouvé de glucosazone dans les liquides d'hydrolyse.

Ils se sont alors adressé aux 2 autres méthodes.

1. ***Hydrolyse de l'allolactose.*** — 5 à 6 g. d'allolactose impur, dissous dans 100 cm^3 d'eau, sont traités par la phénylhydrazine à chaud. Les 2 g. d'osazone obtenus furent soumis à

l'ébullition pendant 1 1/2 heure en présence de 50 cm³ de HCl au 1/20. Le mélange, très noir, fut décoloré par le noir animal, et la solution concentrée dans le vide.

Les auteurs se contentèrent d'identifier par les caractères microscopiques de son osazone le sucre présent dans la solution. L'osazone, assez peu soluble dans l'eau chaude, cristallisait par refroidissement. « Examinée au microscope, elle se présentait sous l'aspect habituel de la galactosazone. On ne distinguait aucune gerbe typique de glucosazone ».

2. ***Obtention de cyanhydrine.*** — Un allolactose impur est dissous dans l'eau et soumis à l'action de CNK, à 37°. Après divers traitements : sulfate d'Ag, H_2S, etc., la liqueur renfermant l'acide allolactosecarbonique est chauffée avec SO_4H_2 au réfrigérant ascendant durant 1 heure 1/2. La liqueur, neutralisée par CO_3Ba, est concentrée à basse température. Traitée par la phénylhydrazine, elle donne « une osazone n'apparaissant que par refroidissement, ayant l'aspect microscopique de la galactosazone et absolument privée de glucosazone ».

Avec la méthyphénylhydrazine, une hydrazone est obtenue et identifiée, par son point de fusion (+ 196°), à la méthylphénylgalactose-hydrazone.

Les auteurs concluent de ces faits que, dans l'allolactose, c'est le glucose qui porte le groupe réducteur.

L'allolactose est-il le β-d-*galactosido*-d-*glucose d'*Helferich ? — Helferich [**65**] a décrit en 1926, un diholoside de synthèse le 6-β-galactosido-*d*-glucose. Celui-ci a été obtenu à partir de l'octacétate, ce dernier préparé par action de l'acétobromogalactose sur le tétracétyl (1,2,3,4) glucose.

Le biose isolé est amorphe, il a un pouvoir rotatoire de $[\alpha]_D = + 36°$. Il donne une osazone qui fond à + 185° et présente un pouvoir rotatoire qui, d'abord de — 69° (en solution pyridique), descend rapidement jusqu'à — 29°, en s'accompagnant d'un brunissement de la solution ; ce qui empêche de suivre plus loin l'abaissement du pouvoir rotatoire.

Depuis, Helferich [**66**] a perfectionné la méthode de préparation, et obtenu le β-galactosido-glucose à l'état cristallisé. Ce dernier fond à 174°-176° avec décomposition. Il présente le phénomène de la mutarotation : $[\alpha]_D^{18°} = + 54°2$, cinq minutes après dissolution, enfin $[\alpha]_D^{18°} = + 30°7$ après 24 heures.

L'osazone fond à 188-189° avec décomposition. Elle se montre, en solution dans la pyridine, lévogyre $[\alpha]_D^{18°} = — 74°5$ de

suite ; $[\alpha]_D^{18°} = -51°6$ après 24 heures. L'allolactosazone dévie aussi à gauche le plan de la lumière polarisée.

On voit que les propriétés du diholoside de synthèse sont très voisines de celles décrites pour l'allolactose. Il n'est donc pas impossible qu'en poussant plus loin la purification de ce dernier sucre, on arrive à l'identifier avec le 6-β-*d*-galactosido-*d*-glucose d'Helferich.

D. — *AUTRES GLUCIDES.*

D'après Polonovski et Lespagnol, il existerait également, dans le lait de Femme, d'autres glucides (ou glycoprotéides) pratiquement insolubles dans l'alcool méthylique et de faible pouvoir réducteur.

Dans cette dernière catégorie, on pourrait faire entrer également la gomme animale de Ritthausen.

Ainsi de nombreuses questions restent en suspens.

CHAPITRE III.

Formation du lactose.

Le lactose est présent dans le lait de tous les Mammifères ; ce dernier semble d'ailleurs sa seule source naturelle (*). Ce diholoside qui représente presque exclusivement la matière sucrée du lait constitue la source principale de la ration hydrocarbonée du jeune Mammifère. Le galactose, renfermé dans le sucre de lait, permet, au cours de la croissance, la synthèse de certains constituants nommés cérébrosides (ou galactolipides) à base de galactose, de sphingosine et d'acides gras en C_{24} (Klenk) : cérasine, phrénosine, nervone, hydroxynervone, qui se rencontrent surtout dans le tissu nerveux (le cerveau renfermerait 3 cérasines, 3 phénosines d'après Chibnall), mais dont certains ont été identifiés également dans les reins, les surrénales, etc. Chez le foetus, le sucre protéidique (qui est un galacto-acétylglucosamino-mannose) et les constituants glucidiques du tissu cérébral sont probablement formés par un réarrangement moléculaire du glucose, fourni par le sang maternel ; il n'y a dès lors aucune raison de supposer que ce processus ne puisse continuer après la naissance.

Le lactose ne se rencontre que chez les Mammifères, et, chez ceux-ci, on ne le trouve généralement que dans le lait (**). Il est donc le produit du travail glandulaire. Cl. Bernard, injectant du glucose dans les veines de Chiennes et de Lapines en lactation, retrouve ce sucre dans toutes les sécrétions *sauf* dans le lait. Ces expériences ont été confirmées par de nombreux auteurs : Nitzescu et Nicolau (1924), Giuski et Rietti (1925), etc. Dans les conditions pathologiques les plus diver-

(*) La seule observation du lactose dans le règne végétal, comme nous l'avons vu, est due à Bouchardat.

(**) Le lactose a été mis en évidence parfois à doses très faibles dans le sang de la veine mammaire.

ses, il semble que le glucose ne franchisse jamais sans être transformé la barrière épithéliale mammaire. Un lait, provenant d'une glande tuberculeuse contiendra plus ou moins de lactose mais jamais on n'y trouvera de glucose (Storch, Monvoisin). Dans le diabète sucré alors que le glucose apparaît dans les diverses sécrétions (salive, sueur, bile, suc pancréatique, etc.) il ne se trouve cependant pas dans le lait et les divers constituants de ce dernier (lactose et autres) se maintiennent au taux normal.

I. — *PHYSIOLOGIE DE LA GLANDE MAMMAIRE TOUCHANT LA FORMATION DU LACTOSE.*

Le rôle de la mamelle dans la formation du lactose a été envisagé, pour la première fois, par Paul Bert (1878). Guidé, tout d'abord, par l'idée d'une analogie entre la formation du glucose et celle du sucre de lait, il suppose qu'il existe dans la mamelle une substance mère, sorte de « lactosogène », voisine du glycogène, susceptible de donner naissance au lactose. Comme les expériences entreprises dans cette voie (en collaboration avec Schutzenberger) ne donnent que des résultats négatifs, P. Bert a l'idée plus heureuse d'observer ce qui se passe chez une femelle que l'on fait couvrir après lui avoir préalablement enlevé les mamelles. Il opère sur des Chèvres, animaux de choix pour l'ablation des glandes mammaires. Si la difficulté des investigations physiologiques réside le plus souvent dans les nombreux obstacles matériels que présente l'étude d'un organe, on doit reconnaître que ce n'est pas le cas pour la glande mammaire. Celle-ci est en effet une glande très abordable, de plus sa fonction peut être supprimée radicalement par l'exérèse de l'organe sécréteur sans que cette opération puisse retentir en quoi que ce soit sur la santé ou la vie de l'individu.

Les animaux, ayant subi l'ablation des mamelles, ne présentent pas de glycosurie pendant la gestation ; par contre, aussitôt après la parturition ils émettent des urines réduisant la liqueur de Fehling. Paul Bert en conclut que le sucre de lait est produit par l'excrétion mammaire du sucre fabriqué en excès par l'organisme après la parturition.

En 1900, Moore et Parker [103] reprennent les expériences de Paul Bert, mais arrivent à des résultats tout opposés. En

opérant sur deux Chèvres ils remarquent que, normalement, l'urine de ces animaux présente un faible pouvoir réducteur qui n'augmente pas sensiblement après le part.

A leur tour, Marschall et Kirkness [**99**], utilisant la femelle du Cobaye, n'observent après la mise bas, qui est normale, ni hyperglycémie, ni glycosurie. Tous autres sont les résultats de Porcher [**126**], ce dernier conclut de ses recherches qu'au moment de la mise bas des femelles sans mamelles il se produit constamment de la glycosurie. Celle-ci est, d'ailleurs, d'intensité variable pouvant aller jusqu'à 90 g. par litre ; son apparition est rapide, sa disparition de même. Si Moore et Parker n'ont pas obtenu de résultats nets, c'est qu'ils ont examiné les urines trop tardivement.

La glycosurie *post-partum* chez les femelles sans mamelles, qui s'observe facilement chez la Chèvre et la Vache, est moins nette chez la femelle du Cobaye. Néanmoins Porcher réussit à mettre en évidence chez le Cobaye, après la mise bas, la présence de faibles quantités (1 p. 1000) de glucose dans l'urine. Il procède également à l'ablation des mamelles chez des Vaches et des Chèvres en lactation et constate, immédiatement après l'opération, une poussée importante de glucose dans l'urine. D'après lui, dans un cas comme dans l'autre, le glucose qui passe alors dans l'urine était primitivement destiné à être transformé en lactose. La glycosurie constatée à la suite de ces deux sortes d'opérations résulte d'une hyperglycémie notable qu'il est facile de mettre en évidence. La glande étant extirpée, le glucose ne peut plus être transformé en lactose et passe dans l'urine ; de plus, même si la glande est présente, le glucose peut apparaître dans les urines quand le fonctionnement de la glande n'est pas encore établi. Porcher conclut de tout ceci que le lactose est élaboré par la glande mammaire à partir du glucose qui est formé en quantité très abondante par l'organisme.

A ce premier problème se rattache également celui de la présence de sucre dans les urines de la Femme pendant la grossesse et après l'accouchement. On va voir, en effet, que la nature du sucre éliminé par l'urine dépend du fonctionnement ou non de la glande mammaire.

II. — *CIRCONSTANCES DANS LESQUELLES LE LACTOSE PEUT PASSER DANS L'URINE ET DANS LE SANG.*

A. — Sucre urinaire pendant la grossesse et après l'accouchement.

Pour ce genre de recherches l'évaluation du pouvoir réducteur de l'urine, la détermination exacte du glucide éliminé et les techniques utilisées ont une importance de premier ordre.

Le pouvoir réducteur des urines pendant la période puerpérale a été signalé, pour la première fois, par Blot en 1856 [19]. « Le sucre, dit Blot, exsude normalement dans l'urine de toutes les Femmes en couches, de toutes les Femmes nourrices et d'un certain nombre de Femmes enceintes ».

Le travail de Blot suscite de nombreuses recherches en France et à l'étranger. Certains auteurs, Lecomte (1857), Capezuolli (1858), Wiederhold (1857), Brucke (1858), Ivanoff (1861), sont amenés à critiquer et même à nier ce qu'on appelait, d'après Blot, la « *glycosurie physiologique de la Femme nourrice* ».

En 1867, à la Société de Biologie, une discussion s'engage entre Blot et de Sinety ; Blot avance que l'urine d'une Femme nourrice est toujours sucrée, de Sinety qu'il ne trouve jamais de sucre chez la Femme gravide, en quoi ils sont l'un et l'autre trop exclusifs. Toutefois tous deux sont d'accord pour signaler la haute teneur en sucre de l'urine quand brusquement, pour une raison ou une autre, la mulsion vient à être suspendue.

On ne se préoccupe pas jusqu'à cette époque de savoir si le sucre contenu dans l'urine est à l'état de glucose ou de lactose. Par la suite, Cl. Bernard, puis de Sinety [140], montrent l'intérêt de cette différenciation, mais c'est Hofmeister (1877) [71] qui indique le moyen d'isoler le sucre de l'urine et l'identifie au lactose par toutes ses propriétés. Kaltenbach [80] confirme les résultats d'Hofmeister et tous deux substituent le nom de « lactosurie » à celui, employé jusqu'ici, de « glycosurie des Femmes enceintes. » Avec ces deux biologistes s'ouvre une deuxième période dans l'histoire de l'urologie de la Femme en état gravido-puerpéral.

De nombreux auteurs (Ney, Arturo, Mc Cann et Turner, etc.) s'en rapportant au travail d'Hofmeister, admettent, *a*

priori, sans examiner chaque cas particulier, qu'il s'agit toujours de lactose. A la suite de longues recherches sur la lactosurie après l'accouchement, Mc Cann et Turner (1892) arrivent à cette conclusion que le sucre (admis par eux comme lactose) apparaît dans l'urine durant la lactation, mais que l'époque d'apparition varie dans chaque cas ; en général, la plus grande proportion se rencontre du 4e au 5e jour après l'accouchement.

Employant la méthode au chlorure de benzoyl, suivie d'une condensation du sucre avec la phénylhydrazine, Lemaire (1895) constate que le lactose est facilement identifiable par son osazone dans les urines, pendant la période de lactation. Mais, antérieurement à l'accouchement, le glucose est le seul sucre qui puisse être décelé. Avec le travail de Lemaire débute une troisième période car les chercheurs qui vont suivre : Rossa, Brocard, Keim, Leduc, Porcher, etc., utiliseront la méthode aux osazones pour la détermination du sucre urinaire.

Dans sa thèse (Paris, 1898), Leduc admet que toute Femme dont le lactose n'est pas utilisé, soit par suppression de la lactation, soit par obstacle à l'allaitement, l'élimine dans les urines ; le pouvoir réducteur de celles-ci doit être presque entièrement, sinon exclusivement, attribué à ce sucre.

D'après 8 observations, faites par Porcher et Commandeur, sur des Femmes enceintes, l'urine contiendrait du glucose avant l'accouchement (1,5 à 15 g.), et du lactose immédiatement après (2 à 12 g.).

La glycosurie, *ante partum*, s'expliquerait par la surproduction de glucose qui, à ce moment, ne peut être transformé en lactose, la glande ne fonctionnant pas. L'apparition du lactose après l'accouchement prouverait que la glande est entrée en activité, qu'elle a transformé le glucose en lactose et que ce dernier est résorbé et éliminé par l'organisme.

En 1928, Watkins [153] fait une étude détaillée des substances réductrices éliminées par les Femmes pendant la gravidité et l'allaitement. Le sucre est dosé colorimétriquement après fermentation de l'urine par la levure. Vers la fin de la grossesse, Watkins trouve une augmentation du sucre non fermentescible qui se prolonge jusqu'à la délivrance. Après l'accouchement il y a chute nette du sucre, puis une forte augmentation se produit le 5e jour après le puerperum. Le lactose est le seul sucre qui puisse être décelé pendant la période où la glande mammaire commence à s'adapter elle-même à la formation de lactose. Watkins conclut que le lactose est se-

crété pendant la gravidité et après l'accouchement. Cette vue est adoptée par Harrison (1930).

En présence de ces résultats contradictoires, Winter [**164**] reprend la question en 1931. La formation de phénylactosazone est généralement utilisée comme moyen d'identification du lactose, toutefois il est difficile, à partir de l'urine, d'obtenir des échantillons suffisamment purifiés pour permettre une détermination exacte du point de fusion. Au contraire il est possible d'obtenir une lactosazone typique si on a soin d'opérer sur le lactose préalablement isolé de l'urine. Winter ne concentre pas préalablement l'urine, mais la traite par l'acétate neutre de plomb et NH_3. Après décomposition, séparation du plomb, le lactose est isolé par l'alcool dilué. On peut retrouver ainsi 50 p. 100 du lactose ajouté à la dose de 1 g. à 200 cm^3 d'urine normale. La quantité de lactose récupérée (0,50 g.) est suffisante pour une identification (point de fusion, pouvoir rotatoire, osazone, etc.).

Sur 27 Femmes, examinées avant accouchement, 2 seulement émettent une urine réduisant la liqueur cuproalcaline et ne renfermant que du glucose. Dans 2 cas, immédiatement après l'accouchement, le glucide récupéré dans l'urine est le lactose. Après délivrance, le lactose seul passe dans l'urine.

Etudiant ensuite l'alibilité du lactose, Winter donne 50 g. de lactose à des étudiants. Le sucre était consommé 3 1/2 h. après un léger breakfast, les sujets étaient laissés 7 heures sans nourriture. Chez l'Homme la tolérance pour le lactose ingéré, *per os*, est très grande. Si une excrétion a lieu pour des doses supérieures à 50 g. encore est-elle très faible. Le résultat immédiat de l'absorption du lactose, *per os*, est une excrétion en faible proportion de glucose ou de galactose, ou quelquefois des 2 sucres.

B. — **Lactosémie.**

Du moment que le lactose passe dans l'urine, il doit à un moment donné être présent dans le sang. Certains procédés ont été utilisés pour déceler la lactosémie : injection de lactose dans le courant sanguin (Bernheim et Schlayer [**9**]), accumulation de lactose dans le sang lorsque l'écoulement du lait est gêné, en particulier par injection d'air dans le pis des Vaches. En ce qui concerne la présence de lactose dans le sang de la Femme normale, ou allaitant, les essais, quoique nom-

breux, sont peu satisfaisants à cause de la faible concentration en lactose et de l'absence de techniques sensibles.

Winter [165], pour déceler la lactosémie, a recours à l'hydrolyse acide et opère sur des échantillons de 271 cm³. Il ne peut ainsi déceler la présence de lactose dans le sang 3 à 5 jours après le part, quand la lactosurie est déjà manifeste. Il nie, par suite, l'existence d'un seuil pour ce sucre.

Déjà, en 1927, Sjollema [141] avait décrit une technique applicable au dosage de faibles quantités de lactose. Utilisant des adsorbants et traitant les filtrats sanguins selon la méthode de Folin-Wu, il avait pu montrer une augmentation du lactose dans le sang des Vaches allaitant dont le pis avait été insufflé d'air. Mais cette technique réclame une concentration de 20 mg. de lactose p. 100, ce qui rend difficile les expérimentations dans les conditions physiologiques.

Pour déceler le lactose à la concentration de 1 à 2 mg. pour 100 cm³ de sang, Hubbard et Brock [74] décrivent un procédé qui consiste en la préparation de doubles échantillons stériles de plasma. Le premier est ensemencé avec du « *Bacterium coli* » qui détruit tous les sucres usuels, et le second par le « *Bacillus proteus* » susceptible d'attaquer la plupart des sucres habituels, à l'exception du lactose. Les 2 échantillons sont mis à l'étuve pendant 18 h., puis le pouvoir réducteur résiduel est déterminé par la méthode de Folin-Wu modifiée, après enlèvement des protéines et des microorganismes [73]. Le lactose est calculé par différence entre les pouvoirs réducteurs des 2 préparations. La présence de lactose n'a pas été démontrée avec certitude dans tous les échantillons. Sur 38 cas examinés, 10 seulement (dont pour la plupart les échantillons avaient été prélevés entre le 3e et le 8e jour après le part) renfermaient environ 2 mg. de lactose p. 100 cm³ de plasma.

Résumé. — Il ressort de tout ceci que si, *ante partum*, le glucose peut parfois être présent dans l'urine, immédiatement *après l'accouchement* ce glucose est remplacé par du lactose. Chez les Femmes nourrices le seul sucre urinaire caractérisable est le lactose et rien ne permet de supposer qu'il existe un autre sucre.

Comme ce diholoside peut être présent dans l'urine pendant la lactation et qu'il n'est cependant pas toujours décelable dans le sang, il faut admettre que le seuil rénal pour le lactose doit être très bas.

III. — *SOURCE DU LACTOSE.*

Deux hypothèses peuvent expliquer l'origine du sucre de lait : ou celui-ci résulte exclusivement de la transformation que la mamelle fait subir au glucose apporté par le sang, ou bien, partiellement tout au moins, du travail de cette même glande sur le sucre protéidique générateur de galactose.

Au surplus les deux hypothèses peuvent se fondre en une seule, car elles admettent toutes deux que le lactose a pour origine les glucides sanguins. Dans le second cas, le glucide à transformer n'est pas libre (sucre protéidique) mais encastré dans la molécule protéique comme groupement prosthétique, par contre il fournit du galactose directement utilisable pour la synthèse du lactose. Les deux processus du reste peuvent coexister.

Chauveau, en 1856, ayant montré que la teneur en glucose du sang veineux était inférieure à celle du sang artériel, un certain nombre d'auteurs, se basant sur ces résultats, essayent de fixer le rôle du glucose. Kauffmann et Magne [82] se contentent d'une comparaison effectuée chez la Vache entre un sang veineux de la circulation générale (sang jugulaire) et le sang de la veine mammaire qui traverse la mamelle, organe chargé de fabriquer une quantité élevée de glucides (lactose, etc.). Ils constatent que : 1° dans la mamelle tarie, c'est-à-dire au repos complet, la consommation de glucose est sensiblement la même que dans les tissus de la tête ; 2° dans la mamelle en activité sécrétoire, le sang qui la traverse perd toujours une plus forte proportion de sucre que celui qui traverse les tissus de la tête ; 3° l'intensité de la consommation semble être en rapport avec l'activité de la glande.

De son côté, Foa [48] étudie chez la Chèvre la teneur en glucose du sang de la circulation générale (sang carotidien) et du sang de la veine mammaire. La teneur en sucre de ce dernier est fortement diminuée. Foa envisage le rôle possible du sucre protéidique.

Ces expériences sont reprises et complétées par Catchcart (1911), Rihmann (1919). En 1932, Blackwood et Stirling [17] établissent parallèlement les taux en glucose du sang artériel, du sang jugulaire et du sang de la veine mammaire, chez la femelle en lactation, allaitant ou non. La teneur en sucre du sang jugulaire, chez l'animal en lactation, est plus basse que

celle du sang veineux mammaire qui est elle-même plus faible que celle du sang artériel. Chez la femelle allaitant, la teneur en glucose libre du sang jugulaire est plus élevée que celle du sang veineux mammaire tout en restant inférieure à celle du sang artériel.

Divers auteurs estiment, que, d'une part, la différence entre les niveaux du sucre du sang artériel et celui du sang jugulaire correspond au glucose oxydé dans les cellules de la glande mammaire pour des fins énergétiques, et que, d'autre part, la différence entre les taux du glucose sanguin jugulaire et mammaire représente le glucide utilisé par la glande mammaire, non plus cette fois pour des fins énergétiques, mais pour la sécrétion du lactose.

Mais *l'abaissement notable du sang veineux mammaire en glucose, chez l'animal en lactation, peut-il être attribué uniquement à la sécrétion du lactose ?*

Un tel raisonnement admet, *a priori,* que les besoins énergétiques de la glande mammaire sont identiques à ceux de la tête et du cou, tissus irrigués par la jugulaire. En toute rigueur, étant donné le défaut de nos connaissances touchant le métabolisme énergétique de la glande mammaire, on peut dire que des analyses comparatives limitées au sang sont des guides infidèles dans l'étude de la sécrétion du lactose. L'abaissement notable en sucre du sang de la veine mammaire, chez l'animal en lactation, peut en effet être attribuée : en partie à l'augmentation des besoins énergétiques de la glande en activité, en partie à la sécrétion du lait. La part réelle de chacun d'eux est difficile à établir. La question se complique encore du fait que l'on a envisagé le rôle du sucre libre seul, or le sucre protéidique peut jouer un rôle également.

Néanmoins, deux actes physiologiques semblent présider à la sécrétion du sucre de lait : production plus élevée de glucose et transformation de cet hexose en sucre de lait. Le fonctionnement de la glande mammaire est déclenché par l'accouchement sous l'influence de la prolactine (*).

(*) Le sucre éliminé par les urines *ante partum* est le glucose ; après l'accouchement, quand la mamelle est en plein fonctionnement, la glycosurie fait place à la lactosurie.

IV. — *MÉCANISME DE FORMATION DU LACTOSE.*

Müntz [104] avait émis l'hypothèse que le lactose se formerait par union, dans la mamelle, du glucose d'origine sanguine et du galactose d'origine immédiatement alimentaire ; on a dit que cette explication ne saurait valoir que pour les herbivores dont la nourriture renferme des galactanes, mais non pour les carnivores exclusifs. On ignorait alors la présence du galactose dans le sang (sucre protéidique), dans de nombreux tissus (nerveux, cartilagineux, etc...), dans la caséine, la lactalbumine, etc.

Mais si une partie du glucose sanguin doit modifier sa structure stéréochimique pour se transformer en galactose quel mécanisme entre alors en jeu ?

Le glucose et le galactose ne diffèrent que par leur configuration stéréochimique. La seule différence entre le *d*-glucose et le *d*-galactose se trouve dans la configuration de l'atome de carbone (4).

Pareille isomérisation peut-elle être réalisée par des moyens chimiques ?

Les recherches de Lobry de Bruyn et Van Ekenstein [34], de Nef [105] ont bien montré que les alcalis peuvent donner, soit avec le glucose, soit avec le galactose, un mélange de sucres aldéhydiques ou cétoniques isomères, 4 ou 8, en équilibre dynamique. Des solutions aqueuses de *d*-glucose, *d*-fructose, *d*-mannose, en présence de $Ca(OH)_2$, à la température ordinaire, donnent des mélanges composés de *d*-mannose, *d*-glucose, *d*-fructose, *d*-pseudo fructose et aussi α et β *d*-glutose.

En présence des alcalis, le galactose fournit 4 sucres du même ordre : 1° l'isomère stéréochimique : le talose ; 2° le cétose correspondant au talose : le tagatose ; 3° le pseudotagatose identique au *l*-sorbose ; 4° le galtose, isomère du pseudotagatose. Ces expériences ont été effectuées en présence d'alcalis forts, mais des transformations analogues peuvent être provoquées par des bases beaucoup moins fortes telles que l'hydrate de plomb et le carbonate de sodium. Wilbur et Spoehr [160] ont même montré que le phosphate disodique jouit de la même propriété.

On sait également que, sous l'influence d'une solution de

baryte 0,01 N, la *d*-glycéraldéhyde est lentement transformée en dihydroxyacétone. Cette dernière se condense plus rapidement avec la glycéraldéhyde en donnant du *d*-fructose et du *d*-sorbose, mais jamais de *d*-tagatose ni de *d*-psicose. Il semble qu'il y ait formation préférentielle des sucres ayant des groupes hydroxyles *trans* aux atomes 3 et 4 où la synthèse a lieu, alors que le tagatose et le psicose ont des groupes *cis* à ces mêmes positions.

Le passage des glucides du groupe du glucose à ceux du groupe du galactose est donc pratiquement difficile et même impossible de cette façon.

Les inversions de Walden présentent une importance biochimique particulière dans le cas qui nous occupe : transformation glucose-galactose. De récents progrès ont été faits concernant ces inversions qui se produisent pendant l'hydrolyse des dérivés p. toluène sulfonyl dans la série des sucres. Quand un groupement hydroxyle libre est disponible sur l'atome de carbone contigü, l'enlèvement du résidu paratoluènesulfonyl a pour résultat la formation d'un anneau dont la réalisation, comme la rupture, sont généralement accompagnées d'inversion. C'est ainsi que le 2-3-dibenzoyl 4 p.toluène sulfonyl-6-triphénylméthyl α-méthyl-*d*-glucopyranoside, traité par un alcali, donne [108] un dérivé 3-4 anhydro du galactose (inversion au C_4) qui est hydrolysé par HCl sec dans l'acétone en dérivé du *d*-gulose (inversion au C_3) et du *d*-galactose (sans inversion).

Egalement une inversion de Walden peut être réalisée, par action d'$AlCl_3$, sur les acétates des sucres. L'octoacétate de lactose donne de cette manière [128] un disaccharide : le néolactose qui fournit par hydolyse du *d*-altrose ; l'inversion a lieu donc aux C_2 et C_3 de la partie glucose de la molécule.

Levene, Raymond et Walti [92] ont mentionné que l'inversion de Walden, dans la série des glucides, n'apparaît que dans les réactions de substitution portant sur des carbones asymétriques. Ces auteurs ont montré que l'estérification biologique des glucides peut conduire à l'obtention de sucres nouveaux aux dépens de l'un d'entre eux : l'acide fructose-3-phosphorique par exemple. C'est de cette façon que, d'après Robison [131] le *d*-galactose pourrait dériver du *d*-glucose.

L'organisme dispose peut-être d'« isomérases » susceptibles de produire de telles transformations, mais en admettant que le galactose nécessaire arrive en nature à la glande mammaire

ou provienne de la transformation isomérique du glucose, *par quel mécanisme la synthèse du lactose est-elle réalisée ?*

Helferich [67] estime que le procédé selon lequel un monose est converti en un « biose » en présence d'un catalyseur, doit être regardé comme parfaitement assimilable à celui par lequel α et β glucose sont convertis en méthylglucosides. Ceci est en accord avec la théorie classique qui ferait apparaître une synthèse en 2 temps :

(1) α-glucose $\rightleftharpoons$ β-galactose

(2) α-glucose + β-galactose $\overset{(\beta\text{-galactosidase})}{\rightleftharpoons}$ lactose + H_2O

Un certain nombre de travaux ont été entrepris en vue de mettre en évidence une β-galactosidase, une lactase ou des ferments de synthèse.

Bradley (1912) [27], Kleiner et Tauber [86] ne décèlent la présence d'aucune lactase dans des extraits glycérinés de mamelles lactescentes. Basch, Porcher (1909), Svandberg [146] n'observent aucune formation de lactose à partir d'un mélange de glucose et de galactose mis en contact avec des glandes mammaires broyées ou des extraits glycérinés de ces glandes.

En 1934, Michelin et Lewitow [102] prétendent avoir obtenu la formation du lactose dans ces conditions, mais basent leur affirmation uniquement sur des changements dans le pouvoir réducteur de leur solution.

Des résultats plus démonstratifs, relatifs à la synthèse du lactose, sont apportées en 1936 par Grant [59] qui utilise des préparations de glandes mammaires lactescentes encore douées de vitalité. Pour déceler les très petites quantités de lactose formées, il utilise une méthode de fermentation différentielle en employant le *S. fragilis* Jorg. comme réactif biologique du lactose. Des portions de 2 cm^3 de solution saline physiologique oxygénée renfermant ou du glucose (8 mg.) ou du galactose (8 mg.) ou un mélange de glucose et de galactose (4 mg. de chacun) sont mises en contact pendant 6 heures à 37°, avec des poids à peu près égaux de glandes mammaires réparties en coupes minces. A la fin de cette période, la quantité de lactose est déterminée dans chaque cas et les sucres réducteurs dosés d'autre part.

L'auteur recherche également si des esters phosphoriques du fructose, glucose ou galactose ne produisent pas une aug-

mentation dans la synthèse du lactose. On connaît en effet le rôle important de ces esters dans le métabolisme intermédiaire des hydrates de carbone. Les résultats obtenus sont peu démonstratifs : les esters phosphoriques (glucose-6-phosphate, galactose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, etc.) n'augmentent pas la formation de lactose.

Weinbach [154] avait déjà constaté que des préparations *sèches* de glandes mammaires de Rat étaient susceptibles de synthétiser, à partir du glucose, « un matériel » réducteur non fermentescible. Dans une de ses expériences, la quantité de « matériel » formé se trouvant en excédent par rapport au glucose ajouté, il attribua cet excès à un « *lactose precursor* », non réducteur, mais susceptible de le devenir. Peu après Grant essaye d'obtenir une préparation active non vivante, en partant de glandes de Cobaye rapidement refroidies dans la neige carbonique, pulvérisées, mises en suspension dans du sérum physiologique et gardées à 37° avec ou sans addition de glucose, pendant 0,5 à 10 heures. Des fragments étaient prélevés à certains intervalles et le glucose (sucre fermentescible), le galactose et le lactose étaient dosés, après dilution convenable, dans les filtrats déprotéinés selon le procédé de Somogyi. La quantité de lactose, produite dans ces conditions, n'était pas suffisante pour permettre d'affirmer de façon convaincante la présence d'un « *lactose precursor* » non réducteur. Mais, ajoute Grant, ces résultats négatifs ne sont pas définitifs car il reste possible que, en modifiant les conditions expérimentales, l'on puisse retrouver ce « *lactose precursor* ».

N'oublions pas qu'il y a des différences considérables dans la physiologie de la lactation entre des espèces très voisines (Rat, Lapin, Cobaye). Chez le Cobaye femelle, la période d'activité de la glande mammaire se trouve très restreinte, la lactation durant quelques jours seulement, ce n'est donc pas un animal de choix pour des expériences de cet ordre.

Le fluorure de sodium (0,04 M) et l'iodoacétate de soude (0,02 M) empêchent à peu près complètement la synthèse du lactose même par des coupes de glandes mammaires vivantes. Ainsi une glande qui a *perdu sa vitalité* n'a pas de pouvoir synthétisant, de même une préparation de tissu mammaire (obtenue selon le mode employé par Meyerhof pour les extraits glycolytiques actifs du muscle).

On sait que, dans la théorie d'Helferich précédemment exposée, la galactosidase est la diastase envisagée comme né-

cessaire pour le deuxième temps dans la synthèse du lactose, mais Grant n'a pas réussi à la mettre en évidence dans des préparations de glandes mammaires lactescentes.

D'autre part la formation du lactose n'est pas augmentée de façon notable en présence d'un mélange glucose-galactose par rapport à ce qui est obtenu avec le glucose seul.

Ces résultats, conclut Grant, ne sont donc pas ceux que l'on pouvait prévoir si la synthèse du lactose par la glande mammaire réside en une simple juxtaposition du glucose et du galactose par des liens glucosidiques suivant l'équation d'Helferich.

CHAPITRE IV.

Glande mammaire et sécrétion lactée.

I. — *PHASES DU DÉVELOPPEMENT DE LA GLANDE MAMMAIRE.*

La sécrétion du lait est liée intimement à la fonction de génération. Les animaux supérieurs sont, comme on sait, pourvus d'une glande pectorale ou abdominale, la mamelle, qui fonctionne périodiquement et uniquement chez la femelle aussitôt après la naissance des petits.

Certains ont été amenés à considérer la mamelle comme un utérus externe, à la suite d'observations anatomiques faites chez les Marsupiaux. Chez ces mammifères, en effet, les mamelles sont situées au fond d'une poche destinée à contenir les jeunes pendant toute la période de l'allaitement ; cette poche constituant vraiment une matrice extérieure. En effet, chez tous les Mammifères, à la naissance, les petits sont incapables de se nourrir des mêmes aliments que les parents. Le jeune emprunte à sa mère, par l'intermédiaire de cette glande et pendant une période plus ou moins longue, un liquide alimentaire sécrété par les mamelles et caractéristique de chaque espèce : le lait. C'est ainsi que la dissociation foeto-maternelle, réalisée brusquement à la naissance, se tempère du fait de cette phase de transition intercalée dans la nutrition du nouveau-né, en procurant à ce dernier un aliment d'origine exclusivement maternelle. Les mamelles constituent donc bien un organe complémentaire de l'appareil de reproduction.

Des renseignements tirés de l'anatomie comparée, il ressort que la glande mammaire est une glande cutanée, c'est-à-dire dérivée de l'épiderme, glande qui se développe dans une partie bien déterminée de la paroi thoraco-abdominale : la crête mammaire. Cet épaississement de la paroi se cantonne dans la

région pectorale, ou s'étend de l'aisselle à l'aîne sur un trajet plus ou moins long selon les espèces.

Dans l'espèce humaine, jusqu'à la naissance, la mamelle se présente sous forme d'une petite masse glandulaire, bilatérale, constituée par une vingtaine de nodules accolés prenant contact isolément avec la surface du mamelon. Cet organe embryonnaire se développera très lentement par la suite, puis présentera un brusque accroissement de volume, chez la jeune fille, très peu avant l'établissement de la puberté.

Ce n'est cependant qu'à l'occasion d'une grossesse que la glande acquiert son activité et fonctionne d'une manière continue. Lorsque la sécrétion mammaire s'établit, ce n'est pas du lait qui est sécrété immédiatement, mais un liquide jaunâtre, visqueux : le colostrum dont les propriétés et la composition se modifient peu à peu pour devenir, au bout de quelques jours, celles du lait normal. Les acini glandulaires prennent un grand développement au moment de la lactation et c'est à l'activité spéciale de leur épithélium que sera due la sécrétion du lait. Les cellules polyèdriques de l'acinus, d'après Partsch et Heidenhein, se gonflent, deviennent plus claires, en même temps que leurs noyaux se multiplient. Le protoplasme se charge de gouttelettes graisseuses qui se collectent du côté de la cavité acineuse. Cette partie de la cellule se distend et finit par se détacher ; le protoplasme disparaît et les globules gras deviennent libres. Mais si la portion apicale se détruit, la partie basale demeure et régénère la cellule. Ainsi la sécrétion mammaire est holo-mérocrine : elle participe à la fois du mode de sécrétion des glandes mérocrines dont les cellules se vident de leur contenu sans destruction du protoplasme, et du mode de sécrétion des glandes holocrines qui se fait par fonte cellulaire. Dans ce dernier cas la cellule, remplie de ses produits d'élaboration, se détache et meurt.

Les différents principes du lait sont fournis par l'activité spéciale de la glande mammaire et ne sont pas uniquement tirés du sang. La caséine n'existe pas dans le sang ; il n'y a point de lactose dans les liquides de l'organisme autres que le lait. La glande mammaire produit elle-même les phosphatides du lait.

Quelques semaines après la cessation de l'allaitement, la glande mammaire, chez la Femme, retrouve les caractères de la glande adulte pubère. Chez d'autres espèces, l'involution est plus accentuée : la glande mammaire reprend l'aspect corres-

pondant à la période infantile (Chauve-Souris). Après la ménopause, la mamelle poursuit son involution et se réduit à quelques canaux galactophores dans un tissu fibro-adipeux plus ou moins abondant.

II. — *INFLUENCE DE L'OVAIRE SUR L'HYPERTROPHIE MAMMAIRE GRAVIDIQUE.*

L'évolution progressive de la glande mammaire jusqu'à l'époque où se manifeste son activité fonctionnelle a beaucoup retenu l'attention des physiologistes. On est conduit à se demander si la mise en train de la glande n'est pas le fait d'excitation de nature chimique provenant d'autres organes plus ou moins éloignés. Ainsi, s'inspirant de la notion nouvelle des glandes à sécrétion interne due à Claude Bernard et Brown-Sequard, on incrimina tout d'abord une influence ovarienne en partant de ce fait que l'épanouissement de la glande accompagne la puberté.

On sait que, chez l'animal, dès la fécondation, la mamelle s'hypertrophie progressivement, mais ne sécrète du lait que quelques heures après la mise bas. L'influence de l'ovaire sur l'hypertrophie mammaire gravidique est mise en évidence, en 1909-1912, par Ancel et Bouin. Cette hypertrophie est conditionnée par les sécrétions internes de l'ovaire puisque l'ablation de cet organe et en particulier du tissu ovarien, entrave la lactation chez la Lapine en gestation. Les recherches plus récentes d'Allen et Doisy, Ascheim et Zondek, Butenandt, Laqueur, Marrian, etc., ont permis d'isoler les hormones ovariennes : folliculines et progestérone qui déterminent le développement du parenchyme mammaire. Dès lors on comprend pourquoi la glande subit une poussée évolutive très brusque à la puberté : à cette époque, qui est celle des premières ovulations, l'ovaire intensifie ses sécrétions internes d'une manière rythmique et précipitée. On saisit la cause de l'accroissement de la glande mammaire pendant la gestation, et de l'atrophie glandulaire de la mamelle à la ménopause chez la Femme, dans le premier cas l'organisme est saturé, dans le second privé des hormones ovariennes efficientes.

L'ovaire adulte a un double rôle : d'une part il assure le développement de l'œuf et en détermine la ponte, d'autre part il sécrète des substances susceptibles de modifier les organes

qui ont la charge d'assurer la fécondation de l'œuf, puis sa nidation. Le cycle complet comprend un certain nombre de phases : phase folliculaire, phase lutéinique, séparées par l'ovulation, puis phase de repos à laquelle succède un nouveau cycle.

Pendant la *phase folliculaire*, qui correspond au développement du follicule de Graaf et à la maturation de l'ovule, ce follicule fonctionne comme glande endocrine en sécrétant des hormones : les folliculines (*).

Quand l'ovule est arrivé à maturation, le follicule se congestionne et devient hémorragique, puis éclate pour laisser échapper l'ovule (*stade d'ovulation*). La plaie ainsi formée se cicatrise et donne naissance au corps jaune : *phase lutéinique*. Ce corps jaune, jouant à son tour le rôle de glande à sécrétion interne, fabrique une hormone particulière : la progestérone. Le rôle de celle-ci consiste à modifier les parois de la muqueuse de l'utérus en volume pour permettre la fixation ou nidation de l'ovule fécondé. Pour que cette hormone exerce son action sur l'utérus il faut que celui-ci ait été en quelque sorte sensibilisé par la folliculine. Si, au cours du cycle, l'ovule n'est pas fécondé, cette période est suivie d'une involution de la partie utérine avec desquamation accompagnée d'hémorragie : la menstruation qui correspond en quelque sorte à un avortement de l'ovule. Si, au contraire, l'ovule a été fécondé, le corps jaune demeure, continue sa sécrétion et va avoir une influence sur le développement de la glande mammaire elle-même.

En effet les recherches expérimentales ont démontré que l'hypertrophie mammaire est toujours obtenue, chez les deux sexes (Goldberg, 1933 ; Houssay, 1936), à la suite d'injections de folliculine ou par la pratique des greffes ovariennes. L'hormone du corps jaune (progestérone) préparerait l'épithélium sécrétoire à sa future tâche, elle serait responsable de l'accroissement des acini sécrétoires.

On a d'abord considéré l'action stimulante produite sur la mamelle par les hormones ovariennes comme directe. Mais,

(*) On désigne sous ce nom plusieurs principes chimiques définis par leur forme cristalline et leur structure moléculaire. Il s'agit de substances très voisines et possédant le pouvoir œstrogène :

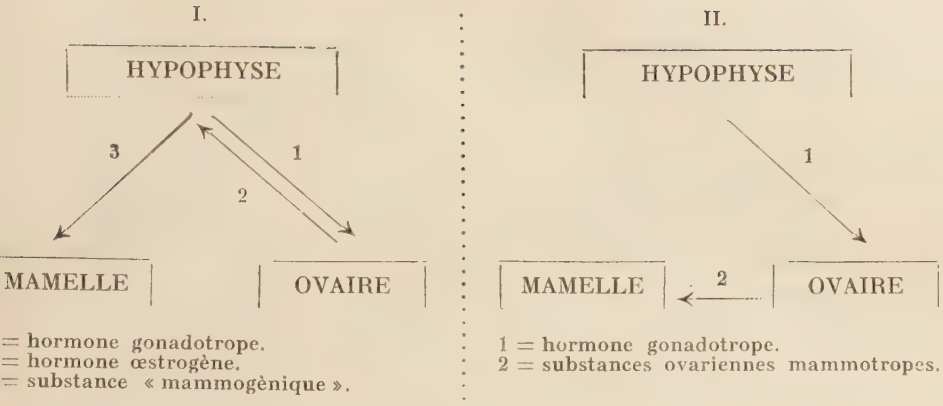
œstrone (α-folliculine, theelin)
œstriol (theelol, hydrate de folliculine)
œstradiol (dihydrofolliculine, dihydrotheelin)

On ne peut affirmer que l'hormone ovarienne circule dans l'organisme sous la forme isolée de l'urine ; il est toutefois vraisemblable qu'elle est identique à l'une d'elle : dihydrofolliculine pour certains (Mc Corquodale, Thayer et Doisy).

le jour où ces substances ont été injectées à des animaux sans hypophyse, on a constaté qu'elles étaient incapables d'empêcher l'involution de la glande ; *la présence de l'hypophyse* (comme l'ont montré Selye, Collip et Thomson [137]) *devait donc être considérée comme indispensable pour la réaction.* Plus tard, on a été amené à envisager l'existence d'une substance hypophysaire « *mammogénique* » qui se trouverait dans l'hypophyse des animaux gravides et des animaux traités à la folliculine. Gomez et Turner [56], dans un mémoire étendu, on montré en effet que, chez les animaux hypophysectomisés, les diverses hormones (œstriol, progestérone, cortine, adrénotropique, thyrotropique) données seules ou combinées ne provoquent pas le développement de la glande mammaire. Mais, si l'on ne réalise qu'une hypophysectomie partielle, des injections d'œstriol amènent la croissance de cette glande. Ils rapportent aussi que des greffes d'hypophyse de Rats normaux pratiquées sur des Cochons d'Inde non adultes n'amènent aucun développement des conduits mammaires si les donneurs n'ont pas reçu préalablement pendant 20 jours des injections journalières de 100 U. I. d'hormone œstrogène.

On pouvait cependant penser que le manque d'action des substances œstrogènes sur la mamelle des animaux hypophysectomisés n'était pas une raison suffisante pour écarter complètement l'ovaire comme lieu de production des substances actives sur la mamelle. Les expériences de Chamorro [30] montrent que *la sécrétion interne des ovaires stimule la mamelle en l'absence d'hypophyse.* Des Souris femelles et des Rats femelles hypophysoprives sont injectés avec des extraits gonadotropes afin de maintenir les ovaires en action, chaque animal traité ayant un témoin de la même portée en général, du même âge tout au moins. Il constate que les ovaires des Rats hypophysectomisés sécrètent, sous l'influence d'extraits d'hormones gonadotropes, des substances « *mammogéniques* » qui stimulent directement la mamelle. L'hypophyse ayant comme rôle d'exciter l'ovaire pour cette sécrétion.

Voici comment Chamorro schématise les deux conceptions expliquant les rapports entre l'hypophyse, l'ovaire et la mamelle :



Selon la première (schéma I) « la substance directement responsable de la stimulation de la mamelle serait sécrétée par l'hypophyse sous l'influence des hormones œstrogènes ».

Pour les partisans de la seconde (schéma II) « la ou les substances actives sont sécrétées par l'ovaire sous l'influence des hormones gonadotropes ».

Ainsi *l'augmentation de volume de la glande mammaire est donc bien conditionnée par la sécrétion interne de l'ovaire avec intervention ou non de l'hypophyse.* L'ovaire favorise le développement du tissu glandulaire, pendant les premières semaines de la grossesse, en lançant dans la circulation les hormones : folliculines et progestérone. Mais le fait de la sécrétion lactée proprement dite ne peut s'expliquer uniquement par l'intervention de facteurs ovariens. L'existence du lactose est étroitement liée à l'établissement de la fonction mammaire. Il faut que le parenchyme mammaire entre en activité pour que la formation du lait ait lieu, mais cette activité sommeille pendant longtemps. Elle est faible à la période qui précède l'accouchement et, à ce moment, elle ne se manifeste que par une sécrétion colostrale, parfois très réduite, puis, par la suite, elle s'accentue rapidement.

Pourquoi cette montée laiteuse qui suit immédiatement l'accouchement ? Que se produit-il à ce moment dans l'organisme maternel qui déclenche l'apparition du lait ?

III. — *DÉTERMINISME DE LA SÉCRÉTION LACTÉE.*

A. — Influence du système nerveux.

A la suite de la découverte des nerfs de la mamelle, la théorie nerveuse demeura pendant longtemps la seule explication donnée au phénomène du déclenchement de la montée laiteuse. *L'action du système nerveux sur la sécrétion mammaire paraissait évidente :* la succion du mamelon active la formation du lait puisque le lait tarit rapidement si les tétées sont supprimées ; la traite, chez les animaux, détermine une suractivité de la sécrétion ce qui fait penser immédiatement à une excitation d'ordre réflexe à point de départ superficiel. Dans le fait que les émotions, la peur, sont susceptibles d'arrêter la sécrétion, on reconnaissait le résultat d'une inhibition des centres nerveux supérieurs.

Cependant on démontra tout d'abord que l'action du *système nerveux périphérique* sur l'apparition ou le maintien de la sécrétion lactée est nulle ou extrêmement réduite (Eckhard, 1855 ; Laffont, 1879 ; de Sinety, 1879), la section des nerfs mammaires paraissant sans effet sur la lactation (Rohrig).

De même le *système nerveux végétatif* ne semble pas influencer la sécrétion lactée, ainsi que le montre l'ablation de ce système dans la partie touchant la glande mammaire (plexus hypogastrique, nerfs thoraciques et intercostaux ; Pfister, 1901 ; Basch, 1903). D'autre part, Ribbert (1898) et Pfister (1901), transplantant une des mamelles en un autre point du corps, voient, après le part, cette glande entrer en activité. Il est évident dès lors que les systèmes nerveux périphérique et végétatif ne conditionnent pas essentiellement le fonctionnement de la mamelle.

Mais ne peut-il y avoir influence du *système nerveux central ?* Les sections expérimentales de la moëlle n'influencent ni le développement de la mamelle, ni la lactation (Goltz et Frensberg, 1873 ; Goltz et Ewald, 1896). Ces derniers, pratiquant chez une Chienne la résection de la moelle dorso lombaire (ce qui entraîne la dégénérescence de toutes les fibres nerveuses se rendant à la glande), constatent néanmoins que la sécrétion du lait est normale après la mise-bas. Porcher signale une observation clinique qui semble corroborer ces faits : une femme, enceinte de 7 mois, se cisaille la moelle

épinière en faisant une chute. Survivant quelques mois, elle accouche régulièrement au 9e mois et peut allaiter son enfant. Cependant il faut faire remarquer que, chez la Femme tout au moins, la section traumatique de la moelle entrave d'ordinaire la montée laiteuse.

Bien que le système nerveux central ou sympathique ne conditionne pas essentiellement le fonctionnement de la mamelle, il peut néanmoins jouer le rôle d'élément excitateur sinon de la sécrétion, du moins de l'excrétion de la glande.

L'absence de contrôle nerveux direct sur la sécrétion lactée a été démontré encore récemment par de nombreuses expériences (Cannon et Bright, 19°2 ; Bacq et L. Brouha, 1932 ; Hinsey et Markee, 1933). Cependant nous verrons que la glande mammaire peut subir une stimulation nerveuse sous l'influence d'une incitation à point de départ utérin, puis mamelonnaire, mettant en jeu le système cérébro-spinal.

B. — Contrôle hormonal de la glande mammaire.

Après avoir essayé de mettre ainsi en lumière le rôle de divers facteurs, on a pensé à un contrôle hormonal de la glande mammaire et on a suggéré que l'accumulation des produits de sécrétion et la production de lait, de lactose par suite, serait en relation avec l'hypophyse.

L'importance de cette glande, située à la base du cerveau, s'affirme de jour en jour. Nous venons de voir que le développement des gonades et leur activité chez l'adulte sont sous la dépendance de l'hypophyse. En particulier par ses hormones (gonadostimuline A, gonadostimuline B, gonadostimuline C ; Fevold et Hisaw ; Wallen-Lawrence ; Ewans, etc.) elle incite le développement de la glande génitale, cette glande détermine secondairement, par les hormones qu'elle sécrète à son tour, le développement de tout le tractus génital.

Par ses produits spécifiques, *les stimulines* qu'elle déverse dans les vaisseaux sanguins et le tissu nerveux, elle règle l'activité de plusieurs autres glandes à sécrétion interne (thymus, parathyroïde, pancréas endocrinien, surrénales, etc.). Plusieurs des interactions qui relient les autres glandes endocriniennes s'exercent par son intermédiaire. D'autre part, l'hypophyse reçoit d'autres glandes des impressions qui modifient sa propre structure et influencent son fonctionnement. Elle joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre des glandes en-

docrines, constituant un véritable « *cerveau endocrinien* » (Barger).

Parmi les hormones hypophysaires : *la gonadostimuline A* provoque le développement de la cellule géminale, la maturation ovulaire et folliculaire ; *la gonadostimuline B*, hormone lutéinisante, agit sur les dérivés du tissu connectif et permet la transformation du follicule hémorragique en corps jaune ; *la gonadostimuline C* est la substance « synergique » du prolan B (*).

Si le développement de la glande mammaire pendant la grossesse est sous la dépendance de facteurs humoraux d'origine ovarienne et hypophysaire, le déclenchement de la sécrétion lactée est conditionné par le passage dans le sang d'une hormone sécrétée par le lobe antérieur de l'hypophyse : la prolactine.

C'est l'existence et le mécanisme d'action de cette hormone lactogène hypophysaire que nous allons envisager.

Son existence est démontrée par deux séries de faits : 1° l'arrêt de la lactation chez l'animal hypophysectomisé ; 2° le déclenchement de la sécrétion lactée par injections d'extraits hypophysaires.

1° ***Effet de l'hypophysectomie sur la sécrétion lactée.*** — La fonction lactogène est liée à l'hypophyse, en effet après ovariectomie chez un animal gravide, arrivé à terme, la sécrétion du lait demeure normale (Nelson), mais, par contre, l'hypophysectomie (Allan et Wiles [2], Collip, Selye et Thomson [137] arrête la sécrétion lactée dans tous les cas chez les femelles (Chatte ou Rate). Si l'ablation de l'hypophyse est pratiquée après la mise bas, on voit la sécrétion déjà établie se tarir en 24 ou 48 heures. La montée laiteuse a pu être observée par quelques auteurs chez des animaux hypophysoprives lorsque l'accouchement a lieu à terme, c'est-à-dire quand les glandes mammaires ont acquis leur potentiel sécrétoire maximum. Mais il ne s'agit là que d'une sécrétion très temporaire de 24 à 48 heures.

Des greffes d'hypophyse à des Rats hypophysectomisés ne

(*) Les prolans A et B sont des polypeptides que l'on extrait de l'urine de Femme enceinte, du placenta, du sérum des juments gravides. Principes dont les effets sont voisins des hormones hypophysaires, mais dont l'origine est sans doute différente.

Le prolan A exerce une action qui l'apparente à l'hormone de maturation folliculaire, tandis que le prolan B, d'origine placentaire, rappelle, à l'intensité près, les effets qu'exerce l'hormone lutéinisante chez la femelle.

suffisent pas à maintenir la lactation (Selye, Collip et Thomson [139]).

L'hypophyse est indispensable pour permettre l'apparition de la lactation aussi bien que pour assurer la persistance de la sécrétion.

2° ***Influence des extraits hypophysaires sur la lactation.*** — Ce sont Stricker et Grueter [145] qui, en 1928, apportent une série de faits montrant toute l'influence de la glande pituitaire sur la sécrétion lactée. Injectant à des Lapines castrées, au 10e jour d'une pseudo gestation, des extraits hypophysaires, ils observent l'apparition, quelques jours plus tard, d'une abondante sécrétion lactée. Puis ils analysent systématiquement l'action de l'hypophyse sur la glande mammaire aux différents stades de l'évolution sexuelle.

Ces expériences furent reprises par Corner [32] ; Nelson et Pfiffner ; puis Turner et Gardner (1931) [149] ; Selye, Collip et Thomson (1933) [137] ; Houssay (1935) [72] sur la Chatte, la Rate, les Chiennes gravides, chez lesquelles l'hypophysectomie n'entrave pas la gestation. La lactation, dans ces cas, apparaissant seulement après injection d'extrait hypophysaire, tous insistèrent sur l'existence d'un *équilibre hypophyso-ovarien* contrôlant la lactation.

En 1933 l'étape la plus importante de ces travaux est franchie : l'hormone lactogène du lobe antérieur est isolée et une méthode de dosage physiologique de cette hormone est même établie à la suite des travaux de Riddles, Bates et Dyskshorn [129] d'une part et ceux de Turner et Gardner [53], d'autre part.

L'hormone lactogène a été appelée : galactine (Turner et Gardner), mammotropine (Lyons et Catchpole), *prolactine* (Riddle). C'est ce dernier terme qui a subsisté.

3° ***Préparation de la prolactine.*** Contrairement à toutes les autres hormones hypophysaires connues, la prolactine précipite de ses solutions au point isoélectrique, aussi s'est-on basé sur cette propriété pour en effectuer la préparation. La glande est desséchée par l'alcool éthylique et on fait 3 extractions successives par HCl à pH = 1,5 à 2,5 pendant 48 heures. Puis on ajoute NaOH de façon à obtenir la précipitation maximum à pH = 6,5. La prolactine précipite, le liquide surnageant renferme la gonadostimuline et l'hormone thyrotrope. Après centrifugation, on lave pour débarrasser le précipité de toutes traces de gonadostimuline.

La prolactine, ainsi obtenue par Riddle et Bates, est amorphe. Comme les autres hormones hypophysaires elle n'est pas ultrafiltrable, mais, contrairement à celles-ci, elle n'est pas thermolabile. Elle est détruite par les ferments digestifs ce qui empêche son administration par voie buccale.

Lyons [96] donne des directives détaillées pour préparer des corps de haut pouvoir lactogène à partir de la glande pituitaire du Mouton.

Enfin, un peu plus tard, par une technique identique à celle employée pour la cristallisation de l'insuline, White, Catchpole et Long [155] réussissent à obtenir une *préparation cristallisée*, ayant à peu près le même pouvoir lactogénique que le produit de Lyons et donnant les réactions habituelles des protéines.

Comparant l'efficacité des diverses méthodes préconisées pour l'extraction du principe à activité lactogénique des glandes de Mouton, Bergman et Turner [8] accordent la préférence à l'emploi de l'alcool dilué en milieu alcalin.

4° *Dosage de la prolactine.* L'isolement et l'identification de la prolactine ont été grandement facilités par les travaux de Mc Shan et Turner, Riddle et Bates, Braucher, qui ont montré que cette hormone favorise le développement de la glande du jabot, homologue chez le Pigeon de la glande mammaire des Mammifères.

Au moment de l'éclosion des petits, le jabot de la mère, à la suite d'une abondante desquamation cellulaire, sécrète ce que l'on a improprement appelé le « *lait de jabot* ». On a constaté que l'on pouvait reproduire ce phénomène grâce à des injections de prolactine et cette fois non seulement chez la femelle, mais également chez le mâle ou le Pigeon impubère. De plus, la partie qui subit la prolifération est facile à disséquer et son poids est proportionnel à la dose injectée en fonction d'une courbe logarithmique rectiligne, permettant un dosage rapide et précis, mais il faut choisir de jeunes Pigeons impubères, de race déterminée [166]. On injecte la prolactine par voie intra-musculaire pendant 4 jours, le 5e jour on tue l'animal et on compare avec la courbe d'étalonnage (après correction pour ramener le poids des glandes du jabot à un poids étalon d'animal).

L'unité Pigeon est définie comme « la dose limite qui, injectée à 10 Pigeons, donne, dans la moitié des cas, une réponse positive ; celle-ci étant caractérisée par la présence de deux à trois petites stries sur le jabot » (Shan et Turner).

IV. — *ÉTAT D'ÉQUILIBRE HYPOPHYSO-OVARIEN CONTROLANT LA LACTATION.*

A. — Déclenchement de la lactation.

L'hypophyse, à l'état normal, ne sécrète pas de prolactine, mais est capable, après un accouchement, de mettre cette hormone en circulation. Les premiers expérimentateurs avaient attribué « ce déclenchement » à l'influence de la lutéine, mais de nombreuses recherches ont établi que la folliculine est le facteur essentiel qui prépare la glande pituitaire à la sécrétion d'hormone lactogène.

Chez les Rongeurs, l'administration de folliculine après le part empêche toujours la montée laiteuse et peut également tarir une sécrétion déjà établie (De Jongh [78], Smith [143]). Si, à ce moment, on injecte de la prolactine on voit la lactation survenir immédiatement, ceci tend à prouver que la folliculine inhibe l'hypophyse plutôt que la glande mammaire.

La diminution du lait est un fait clinique habituel chez la Femme qui voit réapparaître ses cycles menstruels pendant l'allaitement, ce qui montre le rôle de la sécrétion ovarienne sur la lactation. Les auteurs s'accordent pour admettre l'existence d'un antagonisme folliculino-hypophysaire, mais la sécrétion mammaire n'est pas déclenchée par un réflexe hormonal pur. *La montée laiteuse,* qui survient normalement quelques jours après l'accouchement, *est due en effet à une double cause :* 1° à la disparition de l'inhibition qui se produisait sur l'hypophyse, mais aussi 2° à une stimulation nerveuse.

1. ***Inhibition hypophysaire.*** — L'hypophyse antérieure s'est adaptée peu à peu, *au cours de la grossesse,* à sa fonction de « mise en charge » d'hormone lactogène sous l'influence de doses croissantes de folliculine. Mais à ce moment la sécrétion de prolactine est empêchée par une double inhibition l'une hormonale (folliculine), l'autre nerveuse due à la réplétion de l'utérus.

Après l'accouchement, la folliculine s'élimine rapidement, comme on sait, par les urines dès l'expulsion du placenta, et la première inhibition cesse. L'autre, liée à l'état de réplétion de l'utérus, s'atténue également au fur et à mesure de l'involution de l'organe.

2. ***Stimulation nerveuse.*** On admet également qu'une stimulation nerveuse de la glande mammaire sous l'influence d'une excitation à point de départ utérin serait déclenchée par la disparition brusque du volume de l'organe. Les expériences suivantes sont, à ce point de vue, très démonstratives : Collip, Selye et Thomson [138] pratiquent, à cet effet, l'ablation des foetus à un Cobaye par césarienne. Cette opération provoque une montée laiteuse, mais, si l'on injecte immédiatement de la paraffine dans la cavité utérine afin d'arrêter son involution, on empêche la lactation par une inhibition vraisemblablement d'ordre mécanique nerveux. Il s'agirait d'un *réflexe utéro-hypophysaire* déclenché par la diminution brusque du volume de l'organe au moment de l'accouchement. De nombreux faits cliniques concernant la Femme viennent à l'appui de cette théorie. A la suite de ces constatations on admet la mise en jeu d'un mécanisme humoral et nerveux.

B. — Maintien de la sécrétion lactée.

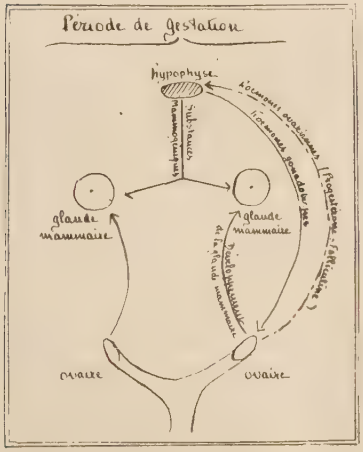
Cette influence des phénomènes nerveux non seulement existe pour le « déclenchement » de la montée laiteuse, mais se retrouve pour assurer la continuité de la sécrétion. Diverses expériences, particulièrement suggestives, peuvent être rappelées ici : à la suite de la ligature des canaux excréteurs de la mamelle chez des Rates en lactation, Selye, Collip et Thomson remarquent que la sécrétion qui ne subit pas d'arrêt si les nouveaux-nés continuent à téter, cesse rapidement si on pratique l'ablation des mamelons au lieu de la ligature des canaux. Plusieurs expériences ont prouvé que la lactation peut se produire dans des glandes transplantées privées de leurs connections nerveuses. Ingelbreght, par des sections étagées de la moelle dorso-lombaire, parvient à insensibiliser les mamelons de Rate en lactation : malgré les tétées la lactation se tarit et les jeunes meurent. Mais, si l'on a la précaution de laisser quelques mamelons, les zones insensibles sécrètent du lait comme les zones sensibles de la glande. Puisque la succion de quelques mamelons restants suffit ainsi à maintenir l'activité sécrétoire de toutes les glandes mammaires de l'animal, ceci tend à prouver que la succion n'a pas une action purement locale.

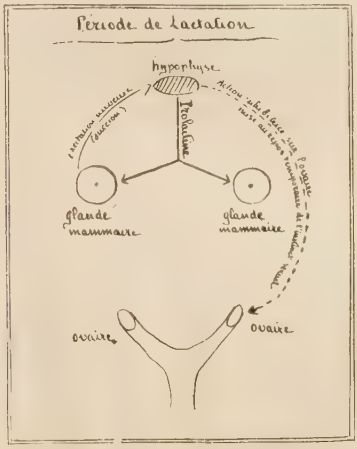
On est ainsi porté à admettre l'*existence d'un réflexe mamelon-mamelle*. L'excitation, déterminant la sécrétion lactée, em-

prunte une voie nerveuse dans son trajet afférent : à point de départ mamelonnaire elle gagne l'axe cérébrospinal et agit sur l'hypophyse. La réponse de la glande pituitaire à cette excitation nerveuse se transmet par voie hormonale (sécrétion de prolactine) aux cellules sécrétrices de la mamelle.

Ces faits peuvent être résumés de la manière suivante :

Pendant la période de gestation les hormones ovariennes (progestérone, folliculine) règlent l'augmentation de volume de la glande mammaire et préparent l'épithélium sécrétoire à sa future tâche ; c'est une action directe sur la glande mammaire. Mais, en même temps, la présence dans l'organisme d'un excès de folliculine empêche l'action de l'hormone lactogène de l'hypophyse, et il y a par suite « mise en charge » de substance lactogène jusqu'au moment de l'accouchement.





Pendant la période de lactation on doit distinguer deux temps :

1er temps. — Dès le moment de la délivrance, le taux de folliculine dans le sang, très élevé pendant la grossesse, tombe brusquement. Cependant l'absence de folliculine ne suffit pas à provoquer l'apparition du lait. Il y a, grâce au réflexe utéro-hypophysaire déjà mentionné, décharge de la substance lactogène et *la montée laiteuse se produit.*

2e temps. — Une fois la sécrétion établie, la succion (excitation mamelonnaire) va jouer un rôle dans la stimulation de

la glande mammaire. L'excitation agit sur l'hypophyse. La glande pituitaire, dont la fonction lactogène est maintenue en activité, transmet l'excitation, par voie humorale, aux cellules sécrétoires de la mamelle qui répondent en assurant une *production de lait continue*. Il y a mise au repos temporaire de l'instinct sexuel.

On trouvera, dans les deux croquis ci-joints, ces divers temps résumés de façon schématique.

V. — *ACTION PHYSIOLOGIQUE DE LA PROLACTINE.*

A. - Utilisation clinique pour obtention d'une sécrétion lactée véritable.

La prolactine étant une lactostimuline il était naturel de l'utiliser chez les Femmes ne présentant pas encore de montée laiteuse au 6e jour après l'accouchement. Kurzrock et Bates [89] traitent 27 Femmes dans ces conditions avec des doses de 75 à 400 unités-Pigeon de prolactine. Dans 23 cas, du 3e au 9e jour, la sécrétion lactée passa de 50 à 400 g. La dose conseillée par ces auteurs est de 125 unités-Pigeon.

Après avoir traité les hypogalacties primitives, on utilisa également avec succès la prolactine dans les cas où la sécrétion lactée cesse brusquement vers le deuxième mois de l'allaitement.

Partant du même principe, Waterman soumet des Vaches à ce traitement afin d'augmenter la production laitière. Avec un extrait alcalin de pituitaire antérieure, Evans [41] réussit à augmenter de 50 p. 100 la quantité de lait chez les Vaches et les Chèvres. Asdell, en outre, à la faveur d'injections de prolactine, parvient à assurer chez des Chèvres une prolongation de la lactation.

Au cours de ces dernières années, il a été établi que, *pour obtenir une sécrétion lactée véritable*, il fallait une action combinée de la folliculine et de la prolactine. Il existe bien, dans l'hypophyse, une hormone à action bien définie : la prolactine, mais ne déterminant la sécrétion lactée qui si la glande mammaire a été préalablement sensibilisée par l'action de la folliculine.

En effet, chez des femelles castrées, à tractus génital atrophié, la prolactine est sans effet sur la glande mammaire ; si,

auparavant, on a eu soin de pratiquer des injections de folliculine et de progestérone, la prolactine produit alors son action lactogène.

Les divergences d'opinion entre les auteurs concernant le déclenchement de la montée laiteuse s'expliquent, en partie, par les grandes différences que présentent à ce point de vue les divers « animaux de laboratoire ». Nous envisagerons 3 types :

Chez le Cobaye. — L'injection de prolactine au Cobaye femelle adulte amène la lactation en 4 jours. Cette action peut même s'exercer indistinctement du sexe si le développement de la glande mammaire a été préalablement provoqué par la folliculine, soit d'ailleurs qu'elle soit sécrétée par l'organisme (femelles gravides) ou fournie par des injections (femelles non gravides, mâles). Il est même facile de faire apparaître une sécrétion lactée temporaire en injectant à un Cobaye non gravide des doses de folliculine (*Menformon* des auteurs allemands). Il suffit simplement de cesser l'administration de folliculine pour obtenir une sécrétion de lait (De Jongh et Dingemann [77] ; Fellner [43].

Chez le Lapin. — Il est nécessaire de combiner l'action de la folliculine et de la prolactine.

Chez la Rate. — La prolactine seule est impuissante à déclencher l'apparition du lait *même* après traitement par la folliculine. Il faut en outre l'intervention d'extraits hypophysaires (Selye, Collip et Thompson, 1933).

Aussi, après Gomez et Turner, Lyons et Catchpole, de Frenery suggère-t-il l'idée que *la prolactine seule ne peut amener de sécrétion lactée normale que dans des conditions normales, après action des hormones œstrogènes de l'organisme.*

Evans [41] constate, en effet, que la prolactine, susceptible d'agir chez des femelles « lactantes », n'a aucun effet sur des femelles « sèches », c'est-à-dire dont la mamelle est au repos. Il semble donc bien que si la prolactine est apte à provoquer une sécrétion lactée véritable dans les cas où elle aurait dû normalement apparaître, il en est autrement pour la sécrétion obtenue chez des mâles ou des animaux vierges.

B. — Lactation en dehors de toute gestation.

I. ***Faits expérimentaux.*** - Nombre d'auteurs se sont efforcés, en ayant recours à la prolactine, de provoquer une lactation anormale en dehors de toute gestation chez les femelles et même chez les mâles.

Par des injections de cette hormone, RIDDLE et BATES obtiennent une sécrétion lactée chez la Guenon en dehors de toute gravidité.

La lactation peut également être provoquée chez le Cobaye mâle castré, préalablement sensibilisé par des injections de folliculine.

Chez la Femme, GESCHICKTER [54] réussit, en dehors de toute grossesse ou de *post partum*, à déterminer une sécrétion lactée à la suite d'injections de folliculine, puis de prolactine, mais en notant combien cette sécrétion fut légère.

KURZROK, BATES, RIDDLE et MILLER [89] relatent également une apparition laiteuse même chez des jeunes filles.

II. ***La sécrétion obtenue est-elle du lait véritable ?*** - Quoiqu'il en soit, dans ces cas, l'action de la prolactine est de courte durée : une ou deux semaines, puis la glande mammaire reprend progressivement son état normal et la sécrétion disparaît, même si l'on augmente la dose de l'hormone. Sans aucun doute, la prolactine provoque l'apparition d'*un fluide qui a l'apparence du lait*, mais peu d'auteurs se sont préoccupés d'étudier la question, pourtant capitale, de la nature exacte de cette sécrétion anormale.

Toutefois, DE JONGH et DINGEMAN [77], en 1931, notent déjà que le lait, obtenu à partir de glande mammaire de Cobayes normaux après arrêt des injections d'œstrine, a un *faible contenu en sucre*.

CATCHPOLE cite un cas de production lactée obtenue chez une Génisse vierge sous l'influence de la prolactine et il en signale la faible teneur en lactose et la haute proportion en chlore. Expérimentant sur des Chèvres vierges, DE FREMERY ne peut obtenir que quelques gouttes d'une sécrétion laiteuse, même en employant la prolactine en grandes quantités. EVANS [40] réussit à provoquer une sécrétion *ressemblant au colostrum*, en traitant des Chèvres vierges par un extrait alcalin de pituitaire, mais il ne spécifie pas le contenu en lactose.

GRANT [59] reprend la question, en 1936, et s'efforce de

déterminer l'action exacte de la prolactine sur la synthèse du lactose par la glande mammaire et la teneur en sucre de la sécrétion obtenue.

Il étudie plusieurs Cobayes femelles en laissant à chaque femelle trois petits. Les petits des Cobayes sont susceptibles de s'alimenter dès leur naissance comme leurs parents, ils n'utilisent que dans une très faible mesure et pendant peu de temps la sécrétion lactée de la mère. Aussi cette sécrétion ne dure-t-elle normalement que quelques jours. Le lait normal de Cobaye renferme 45 à 55 g. par litre de lactose au début de la lactation et 15 g. par litre à la fin. Pendant le 1er et le 2e jour de la lactation on peut recueillir 0,9 cm³ de lait toutes les trois heures, quantité qui s'abaisse à 0,3 cm³ les derniers jours.

Deux semaines après l'apparition de la lactation, Grant sépare les mères des petits. Deux fois par jour les glandes sont malaxées jusqu'à ce qu'elles ne sécrètent plus qu'une petite quantité de liquide séreux sans lactose. A ce moment on pratique des injections journalières, sous-cutanées, de prolactine (2,5 à 16,6 mg. par 100 g. du poids du corps). Les glandes en régression commencent à sécréter en petites quantités un liquide trouble puis, après une période qui varie grandement avec les individus, la sécrétion d'un « lait » est rétablie.

Alors que le lait normal de Cobaye est d'un blanc craie, cette nouvelle sécrétion est jaune pâle et présente, examinée au microscope, de nombreux globules graisseux et des corpuscules de colostrum. Enfin la quantité obtenue est très faible : 0,08 cm³ par jour.

Dans cette sécrétion le lactose était dosé par la méthode de fermentation [58], soit dans un filtrat de déprotéinisation (en traitant le lait par l'hydrate de zinc selon le procédé de Somogyi), soit dans le liquide aqueux obtenu en traitant le résidu sec provenant de l'évaporation d'un extrait alcoolique.

Quand la prolactine est ainsi *injectée* à des animaux *au dernier stade de la lactation, le lactose est bien le seul sucre présent mais à un taux anormalement faible* (0,4 à 2,4 g. p. 1000). D'autre part, *si la femelle est « sèche »*, quand on procède aux injections de prolactine, dut-on prolonger celles-ci pendant deux semaines, on n'arrive à produire qu'une légère sécrétion séreuse trouble, où *le sucre n'est plus du lactose mais du glucose.*

Il faut donc conclure que la sécrétion lactée, obtenue de façon anormale par des injections de prolactine, sécrétion

très faible en quantité d'ailleurs, n'a du lait que *l'apparence physique*, elle s'en *différencie* en particulier par une teneur en lactose très nettement au-dessous de la normale.

De plus, contrairement à ce qui se passe avec les extraits bruts eux-mêmes de pituitaire antérieure, les préparations d'« hormone lactogène » très purifiées, quoique très actives pour amener la croissance de la glande du jabot chez le Pigeon, ne peuvent, pour l'effet lactogène, remplacer entièrement la propre pituitaire de l'animal (Gomez et Turner [57], Nelson et Gaunt [106].

C. — Maintien d'une lactation normale.

D'après des recherches récentes une lactation normale ne pourrait être maintenue que grâce à la présence dans l'alimentation de vitamines L_1 et L_2, mais le rôle physiologique de ces substances est encore mal identifié.

On saisit ainsi toute la complexité du déterminisme de la sécrétion lactée, et pourquoi les opinions les plus opposées ont pu être soutenues successivement par les physiologistes. L'origine hypophysaire de la prolactine et son mode d'action permet cependant d'élucider un point demeuré longtemps mystérieux : celui des lactations anormales.

VI. — *LACTATIONS ANORMALES.*

A l'état normal, comme dans l'intervalle des gestations, la glande mammaire conserve, ou reprend, le type dit « de repos » qui correspond à une réduction très prononcée du parenchyme mammaire. Cette structure sera à peine influencée, en général, pendant la vie sexuelle normale de la Femme. Mais on a noté, depuis très longtemps, qu'il était possible d'observer des lactations anormales, phénomènes d'apparence exceptionnels qui, en réalité, ne sont que des variations temporaires d'un même processus. Telles sont les lactations qui apparaissent chez des nouveau-nés, des jeunes avant l'époque de la puberté, des Femmes après ovariectomie et même chez des mâles.

A. — Lactation du nouveau-né.

Ce phénomène parut au premier abord, si étrange que l'on dénomma « lait de sorcière » le liquide produit pendant la

crise mammaire qui survient chez certains nouveau-nés des deux sexes. Ce fait se retrouve chez un grand nombre d'animaux (Lapin, Chat, Cobaye, Chevreau, etc.). A l'époque de la mise bas, la glande pituitaire des fœtus à terme présente la structure caractéristique de l'« hypophyse de lactation » (Selye, Florentin). Il s'agirait donc bien d'une sécrétion lactée (de Sinety, Barfuth, Brouha, etc.) car la glande mammaire serait préparée par la folliculine si abondante à la fin de la grossesse dans le sang de la Femme. Au moment de la dissociation fœto-maternelle, il y aurait suppression brusque de la folliculine pour l'organisme du nouveau-né ce qui provoquerait une excrétion de prolactine déterminant la montée laiteuse. Le phénomène constaté chez le nouveau-né et le déclenchement de la sécrétion lactée chez la mère auraient donc pour origine un processus de même ordre.

B. **Lactations physiologiques chez la Femme.**

Les cas de galactorrhées observés soit chez des vierges soit chez des multipares longtemps après le dernier accouchement sont toujours en relation avec une hyperplasie de l'hypophyse. Celle-ci sécrète donc très vraisemblablement une hormone galactogène qui agit sur la mamelle préalablement préparée par hyperfolliculinémie ou hyperlutéinémie.

Enfin, si une ovariectomie peut, dans quelques cas, faire apparaître une sécrétion lactée c'est que l'opération supprime brusquement l'hyperfolliculinémie entretenue dans ces cas par les ovaires kystiques. De ce fait, on libère le principe lactogène de l'hypophyse et une sécrétion lactée s'établit spontanément.

En résumé, l'on comprend mieux ainsi que tous les troubles hypophysaires et toutes les affections intéressant plus ou moins directement la sphère génitale aient une répercussion sur la glande mammaire et soient le point de départ d'hyperplasies mammaires accompagnées ou non de lactation nette.

VII — *LACTATION CHEZ LES DIABÉTIQUES.*

La glande mammaire est capable de conserver une autonomie qui lui est propre. Devant une perturbation alimentaire (ingestion de sucres divers, variations alimentaires) ou autres (injection de glucides dans les veines), elle répond non en

présentant dans sa sécrétion un trouble correspondant, mais en donnant moins de lait. Déclenche-t-on une hypoglycémie dans l'organisme : ce n'est pas du lait moins sucré que l'on obtient, c'est une moins grande quantité de lait mais où le taux du lactose reste au voisinage de la normale. Ceci s'entend évidemment pour une glande mammaire en activité normale.

Dans le diabète sucré l'hyperglycémie produit une apparition de glucose dans les diverses sécrétions : salive, sueur, bile, sécrétion pancréatique, etc. On pouvait se demander si, dans ces conditions, le glucose se trouve dans le lait à côté du lactose, ou si la glande mammaire est encore capable de sécréter tout son sucre sous forme de lactose. On sait déjà que la glande mammaire peut, sous certaines conditions (par exemple en injectant la prolactine pendant 2 semaines à des femelles « sèches »), sécréter le glucose inchangé (Grant [59]).

Daoud [33] étudie la lactation chez 2 Femmes diabétiques (cas léger pour l'une, cas grave pour l'autre). Afin d'éviter toute glycosurie les malades recevaient des injections d'insuline pendant la grossesse. D'ailleurs après l'accouchement et pendant la première partie de l'allaitement, le glucose cessa d'apparaître dans l'urine. Les symptômes de soif et de polyurie disparurent également malgré la suppression des injections et l'assouplissement d'un régime plus large en hydrates de carbone. Cet état normal dura 8 mois dans le premier cas et 7 dans le second, après quoi le glucose réapparut dans l'urine. L'hyperglycémie qui survient avant la fin de la lactation est intermédiaire entre celle constatée avant la grossesse et celle qui s'établira après l'arrêt de la lactation.

Ainsi, même en présence d'une concentration élevée de glucose dans le sang, la glande mammaire possède le pouvoir d'empêcher le passage du glucose sanguin dans le lait. Le processus synthétique de la glande constitue un mécanisme efficace pour transformer en lactose tous les sucres apportés. C'est l'absence d'un tel mécanisme dans les autres glandes qui permet d'expliquer l'apparition de glucose dans leurs sécrétions lors d'un diabète.

Influence de l'insuline. — Bien que le glucose soit le seul sucre soumis à l'influence de l'insuline on pouvait penser que l'hypoglycémie consécutive à l'injection de cette hormone aurait un retentissement sur le lactose en formation. Les recherches de Nitzescu et Nicolau, sur l'animal, celles de Win-

TER, de BANU et HERESCO, chez la Femme, montrent que *les injections d'insuline,* si elles abaissent le taux du sucre du sang, *ne modifient cependant pas le taux du lactose* dans le lait qui reste normal. Toutefois la quantité de lait sécrétée devient moindre.

Telle est, exposée en ses traits essentiels, cette question si attrayante du mécanisme physiologique complexe qui déclenche l'apparition de la sécrétion lactée.

CHAPITRE V.

Dosages des glucides dans le lait.

Déterminer la quantité de sucre dans un liquide de l'organisme : sang, lait, liquide céphalo-rachidien, etc., est une opération courante. Cette opération, qui s'impose en de si nombreuses circonstances, a été pratiquée par tant et tant d'analystes qu'on pourrait la supposer basée sur des réactions bien connues, arrêtée dans ses moindres détails et si bien codifiée qu'il n'y ait plus lieu de discuter la meilleure technique. Il n'en est rien cependant.

Tout d'abord ces humeurs ou ces sécrétions sont des liquides complexes, variables dans leur composition avec les espèces ou les individus et encore, chez un même individu, avec les conditions physiologiques du sujet considéré. Les nombreux constituants normaux d'un liquide biologique peuvent, les uns augmenter, les autres diminuer et d'autres sont susceptibles d'apparaître, en particulier dans les cas pathologiques. Aussi importe-t-il, tout d'abord, de faire le prélèvement au moment opportun dans des conditions physiologiques bien déterminées et d'assurer sa conservation sans altération. Claude Bernard, il y a bien longtemps, faisait remarquer que, bien souvent, des chimistes, effectuant des dosages très précis sur des liquides biologiques d'origine indéterminée et conservés sans précaution, se livrent ainsi à un travail inutile.

Le dosage de petites quantités d'un sucre donné, relativement simple, puisqu'il ne comporte que des difficultés d'ordre purement technique, est cependant délicat. La détermination quantitative des sucres dans les humeurs est une question beaucoup plus malaisée et incertaine, car une série de problèmes physiologiques se superpose alors aux problèmes chimiques.

Généralement, on dose en bloc par une méthode appro-

priée les substances réductrices et, par une convention nécessaire, on les estime d'après la masse prépondérante : en glucose ou en lactose par exemple s'il s'agit du sang ou du lait. Mais quelle est la valeur de cette convention ? Les liquides examinés ne renferment-ils, comme réducteurs, que des glucides ? Et, parmi ceux-ci quelle est la part de chacun ? A ces questions il est difficile, actuellement, de répondre de façon définitive, car des faits nouveaux font souvent renaître des controverses que l'on croyait éteintes. En réalité, si un grand nombre de techniques classiques sont encore très imparfaites c'est qu'elles n'ont point fait l'objet d'études systématiques ; or, on ne doit pas, lorsqu'on le peut, négliger d'améliorer une des phases de l'opération — celle-ci, comme nous le verrons, en comporte plusieurs — ce qui, en éliminant une cause d'erreur, permettra peut-être de déceler plus facilement les autres. Les auteurs qui préconisent un mode opératoire se contentent le plus souvent d'ajouter de petites quantités d'un glucide donné au sucre préexistant, et de le retrouver en faisant varier divers facteurs : concentration, etc. Ceci est nécessaire, mais n'est pas suffisant. Il y a une certaine indétermination qui ne peut être levée par la méthode des « quantités ajoutées ». Le fait de retrouver un sucre surajouté est une opération relativement facile ; toutes les bonnes méthodes sont susceptibles de la réaliser. Les divergences entre les résultats commencent précisément lorsqu'on applique à un même liquide de l'organisme diverses techniques qui cependant concordent pour des sucres en solution pure. C'est donc dès l'origine, à la base même, que commence l'erreur. Lorsqu'on fait appel, comme test d'exactitude, à la méthode de vérification dite des quantités ajoutées on peut soit calculer, comme certains auteurs, l'erreur relative sur la quantité totale du sucre (sucre ajouté et sucre originellement présent), soit reporter toute l'erreur relative expérimentale sur la quantité connue (c'est-à-dire ajoutée). Comme nous l'indiquerons dans les tableaux, nous avons employé les deux modes de calcul avec des résultats très satisfaisants. Il est évident que plus la quantité de sucre ajoutée sera grande, plus les méthodes seront concordantes si elles sont adaptées aux dosages du sucre en solution pure, donc plus l'erreur de base *paraîtra réduite*, mais n'en existera pas moins.

Pour le sang, en effectuant la « glycolyse aseptique », on a la possibilité d'éliminer le sucre préexistant, ce qui est un pas

vers la solution du problème, car on se rapproche davantage de la réalité lors de l'addition de sucre. Mais pour le lait, à cause de la trop grande teneur en lactose, entre autres, cette opération est difficilement réalisable, il faudrait recourir à la méthode de fermentation différentielle dont il sera question plus loin.

Par suite, il faut pratiquer, comparativement sur une même liqueur, plusieurs dosages avec des méthodes tout à fait différentes, en utilisant tout d'abord divers déprotéinants, car nous allons voir que le problème de la désalbumination a une importance capitale sur laquelle on ne saurait trop insister.

I. — *DÉPROTÉINISATION DES LIQUIDES BIOLOGIQUES.*

La déprotéinisation des liquides biologiques représente un temps fondamental pour le dosage des glucides Elle doit assurer d'abord une élimination complète des protides et de leurs produits de dégradation, car avec certaines méthodes, en particulier celle de Hagedorn-Jensen, la présence de traces minimes d'albumine et d'acides aminés (tryptophane, tyrosine, etc.) peut fausser un dosage (Hewitt). Elle ne doit pas, autant qu'il est possible, altérer les hydrates de carbone présents. Enfin, il est nécessaire d'éliminer au maximum les substances susceptibles de perturber le dosage. L'idéal en somme serait d'obtenir une solution aussi voisine que possible d'une solution de sucre pur dans l'eau distillée.

En ce qui concerne le sang, qui a été l'objet d'un nombre considérable de travaux et peut être pris comme exemple pour l'étude des liquides biologiques, un grand nombre de réactifs ont été préconisés pour la désalbumination. Rappelons :

Le nitrate mercurique (méthode de Bierry-Portier et Baudouin-Lewin) ;

L'hydrate de fer colloïdal à chaud (Michaelis et Mac Lean) ;

L'hydrate de zinc à chaud (Hagedorn-Jensen) ;

L'hydrate de zinc à froid (Somogyi) ;

L'hydrate de cadmium (Fujita et Iwatake) ;

Le mercure-cadmium (Bierry Magd. et Dumazert) ;

L'acide tungstique (Folin-Wu, Bénédict, Fontès et Thivolle) ;

L'acide trichloracétique (méthode des osazones de Denigès) ;

Les sels d'uranium (méthode de Bang) ;

Le sulfate de cuivre et le tungstate de soude (Somogyi).

D'autres substances ont été également utilisées : sulfate et acétate mercuriques, alcool, acide métaphosphorique, etc.

Cependant, les filtrats sanguins, obtenus à partir de ces divers agents déprotéinisants, ne présentent pas une valeur équivalente pour établir ce qu'on est convenu d'appeler la « glycémie vraie ». On sait, en effet, que si le *d*-glucose, « sucre vrai », forme le gros bloc des matières réductrices du sang il est cependant accompagné d'autres matières réductrices dont la nature est discutée et qui constituent le « non sucre » ou « non sugar » des auteurs Anglo-Américains ou « Restreduktion » des Allemands, « Saccharoïdes » de Bénédict, substances qui, pour la plupart, réduisent la liqueur de Fehling, mais ne subissent pas la fermentation. En outre, des corps azotés ou sulfurés : acide urique, créatinine, glutathion, thionéine, etc., ont une influence perturbatrice assez importante sur les réactifs oxydants mis en jeu pour doser le sucre.

En résumé deux procédés analytiques subsistent pour l'évaluation du « sucre vrai » : le plus direct consiste dans l'emploi d'un *réactif rigoureusement spécifique du glucose* et non influençable par les substances réductrices qui l'accompagnent ; le second est fondé sur l'*élimination préalable des substances parasites* par un procédé chimique approprié. En effet, si la séparation de ces substances est incomplète, le dosage donnera — l'évaluation étant basée sur des méthodes par réduction — un résultat par excès et de plus, par excès indéterminé, touchant la valeur du « sucre vrai ».

Les méthodes de dosage, pour si bonnes qu'elles soient, ne sont jamais spécifiques d'un seul sucre (*), à part quelques-unes : mannose (mannose-hydrazone), galactose (méthylphénylhydrazone, *o*-tolylhydrazone). Elles ne sont pas non plus réfractaires envers les substances réductrices parasites, aussi toute l'attention doit-elle porter sur le procédé de déprotéinisation qui doit être aussi parfait que possible. Mais cependant, il ne peut exister de procédé type de déprotéinisation s'appliquant d'emblée à tous les liquides de l'organisme : sang, lait, lymphe, liquide céphalo-rachidien, etc. Chacun de ces liquides

(*) Il vaudrait mieux, quand on le peut, évaluer un glucide déterminé par une méthode spécifique que par une méthode plus précise, mais non spécifique. Par exemple, le mannose peut être dosé par toutes les méthodes d'évaluation des sucres, mais en outre, à l'état de mannose-hydrazone, car il forme avec la phénylhydrazine une hydrazone insoluble à froid qui est caractéristique. De préférence il faut donc estimer le mannose électivement.

nécessite une étude préalable pour le choix et l'adaptation du réactif à utiliser.

En ce qui concerne les nombreux agents de déprotéinisation indiqués précédemment, pour beaucoup d'entre eux, il y a peu de documents sur leur pouvoir d'élimination des substances qui interfèrent dans le dosage des sucres. Cependant, touchant la désalbumination du sang, deux d'entre eux ont été plus particulièrement étudiés : l'acide tungstique et les sels de mercure.

L'acide tungstique est à la base d'une technique simple et rapide, mais précipite peu de choses en dehors des protides. Au contraire, les sels de mercure, outre les albumines, précipitent à peu près toutes les substances perturbatrices, en particulier les produits de désagrégation des protéines, alors que ceux-ci sont éliminés de façon incomplète par l'acide tungstique (Grevenstuk). Harned a constaté [63], dans les filtrats mercuriques, l'absence presque totale de l'azote non oxydé. Tandis que la désalbumination tungstique laisse persister en moyenne 280 mg. d'azote non oxydé pour 100 cm³ de liquide, Tompsett n'a trouvé que 6 mg. d'azote pour 100 cm³ de filtrat mercurique. Everett, Sheppard et Johson [42] ont d'ailleurs détaillé toutes les substances azotées éliminées par les réactifs mercuriques. Ainsi l'acide tungstique et les sels de mercure possèdent des propriétés déprotéinisantes très différentes et peuvent être considérés comme deux types de précipitant. Avec l'un on obtient un chiffre de glycémie relativement haut (englobant le glucose et peut-être des glucides encore indéterminés), avec l'autre un chiffre moins élevé représentant la glycémie vraie. Nous montrerons que, pour le lait également, le chiffre des oses varie, contrairement à ce que l'on croyait, avec les désalbuminants.

Dans un rapport très documenté, Baudouin [5] a réfuté les objections concernant l'emploi des sels de mercure. En particulier celle de Labbé et Nepveux accusant les sels de mercure de provoquer des pertes en sucre. « Nous n'avons pas constaté, écrit-il, de pertes en opérant sur des solutions de glucose. En employant le nitrate de mercure en macrométhode, ce qui diminue les chances d'erreur, celle-ci ne dépasse pas 2 p. 100 comme l'avaient déjà constaté Bierry et Portier. D'ailleurs, il est vraisemblable que n'importe quel agent de désalbumination peut créer des erreurs de cet ordre du fait de l'adsorption du coagulum albumineux. On peut diminuer

cette cause d'erreur en diluant suffisamment le sang (*). Les sels de mercure n'ont donc aucun des inconvénients qu'on leur avait attribué.. » et il ajoute : « En combinant la désalbumination par le nitrate mercurique, préconisée par Bierry et Portier, avec le dosage par la méthode de Bertrand (G.), on obtient une méthode type dont la valeur est universellement reconnue ».

Comme on le verra, nous avons précisément appliqué ce procédé au dosage du lactose dans le lait comme terme de comparaison. Etant donné l'importance des déprotéinants, voici tout d'abord un bref résumé de ceux qui ont été utilisés pour permetttre le dosage du lactose dans le lait.

II. — *DÉSALBUMINANTS DU LAIT.*

Historique. — Pour le lait on a employé : le métaphosphate de soude (Denigès [37]), l'acide phosphotungstique (Soichoro Miura [144]), le ferrocyanure de potassium et l'acétate de zinc (Carrez [29] et Paget-Dupont [110]), l'hydrate d'alumine (Hans Weiss [62]), le fer colloïdal (Fine [44]), l'acide silicotungstique (Pichon Vendeuil [116], Polonovski [120]). Mais, dès l'origine, les auteurs firent appel aux sels de mercure (**).

En 1884, Willey [161] les utilise pour le dosage du lactose dans le lait par le polarimètre. Puis Pappel et Richmond [112] emploient le nitrate mercurique pour ce même but, tandis que Denigès [35] traite le lait par l'acétate mercurique déjà conseillé par Esbach [38] pour la précipitation de la caséine. Patein et Dufau [113] appellent eux aussi l'attention sur l'emploi des sels de mercure. Charles Porcher [125] en fait usage également et peut écrire dès 1906 : « En chimie physiologique les chercheurs sont aujourd'hui d'accord pour reconnaître ce déféquant comme le meilleur de ceux qui sont utilisés pour l'analyse des liqueurs sucrées les plus diverses (lait, sang, urine) ».

(*) On suppose : 1° que le volume du précipité, supposé sec, soit négligeable ; 2° que l'adsorption du glucose par ce précipité soit également négligeable. Ces hypothèses semblent légitimes avec une dilution convenable.

(**) C'est en 1878 que la première adaptation en fut faite aux liquides biologiques : Tanret additionne de nitrate acide de mercure des urines, neutralise à la soude et dose le glucose dans le liquide clair obtenu par filtration. — (Sur la recherche et le dosage du sucre dans les urines faiblement sucrées. *Bulletin de Thérapeutique*, 1878, p. 207).

En effet, le nitrate mercurique est utilisé par un très grand nombre d'auteurs pour les analyses de lait. Aussi rappellerons-nous, à titre documentaire, deux modes opératoires basés sur ce réactif, l'un de Fleury et Marque [47], l'autre de Denigès [36].

Mode opératoire de Fleury et Marque :

Fleury et Marque proposent de désalbuminer le lait, destiné au dosage du lactose par réduction, par le procédé suivant :

Dans une fiole jaugée de 50 cm³, mettre successivement :

Lait	5 cm³
Eau	30 cm³ (environ)
Nitrate mercurique	1 cm³ (goutte à goutte) (formule de Patein et Dufau).
Eau q.s.p.	50 cm³

Filtrer et prélever pour le dosage 10 cm³ du filtrat qui représentent 1 cm³ de lait, ce dosage étant effectué par *la méthode de* Baudouin et Lewin [5]. Des expériences de contrôle, faites en ajoutant des quantités connues de lactose à du lait, ont permis à ces auteurs de retrouver ce sucre à moins de 1 p. 100 près.

Mode opératoire de Denigès :

1. *Mensuration et dilution du lait.* — Le dosage peut s'effectuer à partir de 1 cm³ ou de 0,1 cm³ de lait. On utilise pour cette mesure une pipette à écoulement total graduée au mercure. Le lait subira, par la suite, une dilution de 1 p. 200 et on opère le dosage sur 5 cm³ de filtrat final qui doit contenir moins de 2,5 mg. de lactose.

2. *Défécation.* — Le lait bien mesuré (1 cm³ ou 0,1 cm³) est introduit dans une fiole jaugée (200 cm³ ou 20 cm³ respectivement), on rince la pipette à plusieurs reprises en utilisant pour ce lavage un volume d'eau égal à la moitié environ de la capacité du vase jaugé. Au volume de lait on ajoute un égal volume du *réactif de* Bierry et Mocquet (*). L'introduction de ce réactif doit être faite goutte à goutte, en remuant sans cesse, pour éviter la formation de gros grumeaux. Ajouter en-

(*) *Formule du réactif* Bierry-Mocquet : à 400 g. de nitrate de mercure, ajouter environ 700 cm³ d'eau. Chauffer vers 40°. Verser une quantité d'acide nitrique suffisante pour tout dissoudre, puis, goutte à goutte, de la lessive de potasse D = 1,33 jusqu'à précipité persistant. Compléter à 1000 cm³ avec de l'eau distillée. Filtrer.

suite quelques gouttes d'une solution alcoolique de phénolphtaléine, puis une solution de KOH environ normale jusqu'à coloration rouge persistante. Enfin revenir en milieu légèrement acide (environ pH = 6,5) par adjonction d'une solution d'acide tartrique à 2 p. 100 dont on ménagera un excès de 2 gouttes.

Après élimination de l'excès de mercure, Denigès termine le dosage par la *méthode molybdo-manganimétrique de* Fontès et Thivolle [50].

On voit que l'emploi du nitrate mercurique est devenu en quelque sorte classique pour les dosages du lactose dans le lait.

III. — *DIVERSES MÉTHODES D'ÉVALUATION DU LACTOSE DANS LE LAIT.*

Les méthodes proposées pour la recherche quantitative du lactose dans le lait sont fort nombreuses, nous allons en envisager quelques-unes :

A. — Méthode polarimétrique.

Le dosage optique du lactose dans le lait a fait l'objet de nombreuses déterminations. Nous ferons plus loin l'exposé de cette méthode.

B. — Méthodes basées sur la réduction des liqueurs cuproalcalines.

On sait que si l'on additionne une liqueur cuproalcaline d'un sucre réducteur et qu'on porte à l'ébullition, il se forme rapidement un précipité rouge d'oxydule Cu_2O. La réduction de l'oxyde de cuivre est corrélative de l'oxydation du sucre. Après ébullition, maintenue un temps bien déterminé, on a d'une part un précipité d'oxyde cuivreux, d'autre part une liqueur partiellement décolorée renfermant l'excès de cuivre.

Le dosage du sucre peut dès lors être fait d'après l'un ou l'autre des deux principes suivants :

ou bien I. — Déterminer la quantité de cuivre réduit et, de cette quantité de cuivre, déduire, au moyen de tables établies à cet effet, la quantité de sucre réducteur dans la prise d'essai.

ou bien II. — Déterminer la quantité de cuivre resté à l'état de sel cuivrique, déduire par différence la quantité de cuivre et de celle-ci, enfin, celle du sucre.

Méthodes du groupe *I*.

La détermination du sucre peut se faire :

A. pondéralement.
B. colorimétriquement.
C. volumétriquement.

Aux méthodes du *groupe A* se rapportent celle de Soxhlet qui pèse Cu_2O, celle d'Allihn qui réduit Cu_2O par l'hydrogène et pèse le cuivre métallique, celle de Morel qui dissout Cu_2O dans l'acide nitrique et dose le cuivre par électrolyse.

Dans le *groupe B* se range la méthode de Folin-Wu [49] (appréciation de la coloration bleue que donne l'oxyde cuivreux dissous dans HCl avec un réactif phosphomolybdotungstique), etc.

Parmi les méthodes du *groupe C*, on peut noter celle d'Ivar Bang, Mac Lean [97], Schaffer et Hartmann, Mohr-Bertrand qui dosent l'oxydule. Nous décrirons cette dernière de beaucoup la plus précise.

On peut rattacher à ce groupe la méthode de Fontès et Thivolle qui traitent, comme Folin-Wu, l'oxydule par une solution phosphomolybdique, mais terminent par le permanganate en réoxydant le bleu de molybdène jusqu'à disparition de la teinte bleue.

Méthodes du groupe II.

On évalue non plus le cuivre réduit, mais le cuivre resté en solution à l'état cuivrique. En principe toutes les méthodes de dosage du cuivre peuvent être employées dès l'instant où elles sont précises. C'est par exemple la méthode de Lehmann-Grimbert : on dose le cuivre en s'appuyant sur la réaction donnée par le sulfate de cuivre avec l'iodure de potassium, il se fait du sulfate de potassium et de l'iodure cuivreux ; l'iode libéré est dosé par l'hyposulfite. Schmoorl et Kolthoff, Boutot ont modifié cette technique.

C. Méthodes basées sur la réduction de corps autres que l'oxyde cuivrique.

Dans certaines de ces méthodes on utilise, au lieu des sels de cuivre, des solutions ammoniacales d'argent (Henderson), de bismuth (Nylander) ou de mercure (Baudouin-Lewin [5]). Ces derniers auteurs dosent, en milieu acide, par une solution

titrée d'iodate, le mercure métallique résultant de la réduction du réactif mercurique par le sucre. Fleury et Marque [47] ont appliqué ce procédé au dosage du lactose.

La méthode de Lewis-Bénédict [94] est basée sur la réduction que le glucose fait subir, en milieu alcalin, à l'acide picrique avec transformation en acide picramique. Pacini et Russel [111] proposent une méthode colorimétrique à l'acide picrique pour l'évaluation du lactose dans le lait qui est une modification de la méthode de Lewis-Bénédict.

On peut utiliser la transformation du ferricyanure en ferrocyanure sous l'influence de réducteurs et en milieu alcalin. Jonesco [76] dose le ferrocyanure produit en utilisant le permanganate, tandis que Hagedorn-Jensen [61] estiment le ferricyanure restant en se servant d'iode.

On peut, enfin, citer une méthode volumétrique pour la détermination du lactose par le permanganate alcalin, appliquée au lait par Adriano [1] qui permet une opération rapide, et la *méthode à la chloramine T* qui fut proposée par Hinton et Macara [70]. La chloramine T de formule

$$C_6H_4\begin{cases}CH_3\\SO_2Na = NCl\end{cases}$$

est un sel de sodium du toluène parasulfamide, elle possède la propriété de libérer l'iode de l'iodure de potassium en solution acide. Fine [44] utilise cette propriété pour doser le lactose dans le lait. Il opère ainsi : à 25 cm³ de sérum de lait (lait désalbuminé par le fer colloïdal), on ajoute 3 cm³ de soude, 20 cm³ d'une solution d'iodure de potassium à 10 p. 100, puis 50 cm³ de chloramine T N/20. Après avoir laissé en contact 1 heure et demie, on acidifie le milieu par 10 cm³ de HCl 2N et on titre par l'hyposulfite N/20. On fait un témoin avec 25 cm³ d'eau distillée et les mêmes réactifs.

Soit X la différence entre le témoin et l'essai on a :

$$\text{Lactose p. 100} = 0{,}036\ X$$

D. Méthodes basées sur l'oxydation par les halogènes en milieu alcalin.

Elles ont l'avantage de bénéficier de la netteté et de la sensibilité incomparable des dosages iodométriques, mais sont appliquables aux seuls aldoses. Elles seront décrites plus loin.

E. — Méthodes biologiques.

Elles sont basées sur l'action de levures appropriées pouvant fermenter spécifiquement certains sucres et non d'autres.

Depuis la découverte par Duclaux d'une levure faisant fermenter le lactose, il a été décrit un grand nombre de *saccharomyces* doués de cette propriété ; Kayser [84], en particulier, en a étudié trois de différentes origines, qu'il désigne, dans son mémoire, par les lettres a, b, c. Elles poussent très bien dans un milieu formé de lactose et de bouillon Liebig par exemple.

Dienert, Mazé, ont mis à profit l'action simultanée de différentes levures, les unes susceptibles de faire fermenter le lactose, les autres le glucose seulement, pour le dosage de différents sucres en présence de lactose.

D'autres auteurs, Hubbard et Brock [74] en particulier, utilisent la *méthode de fermentation différentielle* pour évaluer le lactose dans le plasma sanguin, pendant la grossesse et la lactation chez la Femme. Se basant sur la propriété que possède le *Bacillus coli communis* de détruire le lactose au fur et à mesure de ses besoins, ils créent une méthode capable de déceler une proportion de 1 à 2 mg. de lactose. L'essentiel de la technique a été donné dans le chapitre : origine du lactose.

La méthode de fermentation différentielle pourrait, à une dilution convenable, être employée pour le dosage du lactose dans le lait.

RECHERCHES PERSONNELLES.

Nous avons exposé précédemment les critiques que l'on pouvait faire aux analyses ayant trait au dosage des glucides dans les liquides biologiques. Pour répondre à ces critiques, nous avons appliqué au dosage du « sucre » dans le lait des méthodes très diverses et des agents de déprotéinisation très différents. Nous nous sommes arrêtés, après de nombreux essais, aux techniques suivantes : acide silicotungstique (*) et sels de mercure, cette dernière étant considérée comme le procédé classique. Nous avons tenu à employer parallèlement le nitrate mercurique et le sulfate mercurique

Nous allons exposer successivement les divers temps qui président à un dosage de « sucre » dans le lait selon le mode opératoire que nous utilisons.

Cette opération comporte tout d'abord :

1° la récolte du lait, puis
2° la déprotéinisation, et enfin
3° les dosages proprement dits.

PREMIER TEMPS : RÉCOLTE DU LAIT.

La question du prélèvement du lait a une grande importance si l'on veut obtenir toute les garanties désirables dans les opérations de dosage, c'est pourquoi nous insisterons sur quelques précautions à prendre.

L'emploi du tire-lait est entièrement à prohiber ici, dans les Maternités cet appareil étant généralement nettoyé à l'alcool ou à l'éther, de petites quantités de ces produits subsistent immanquablement dans les raccords en caoutchouc et suffisent pour entacher d'erreur certains dosages. Le lait, recueilli, directement du sein par simple pression, dans un flacon rigoureusement propre et sec, doit être traité le plus rapidement possible.

Le moment où nous avons effectué nos prélèvements de lait a varié selon le but que nous nous proposions, si nous vou-

(*) Nous n'avons pas employé l'acide tungstique et ses sels parce que, outre leur inefficacité dans l'élimination des produits dégradés des protéines, ils donnent, ainsi d'ailleurs que l'acide métaphosphorique, des filtrats troubles, comme le signale Polonovski [**120**]. La méthode au métaphosphate est longue à effectuer dans le cas du lait humain car le sérum obtenu est très difficile à filtrer. Denigès [**36**] a proposé d'ajouter une liqueur albumineuse pour faciliter la filtration ce qui complique encore cette méthode de dosage.

lions, par exemple, étudier les variations physiologiques du lactose dans le lait sous l'influence de divers facteurs. Mais, lorsque nous ne donnons pas d'indications spéciales, nos prélèvements, d'une manière générale, étaient effectués pendant la 3e tétée de la journée (tétée de 11 heure 1/2). C'est, en effet, le moment de la journée où le lait a la meilleure composition moyenne. Pour la même raison nous avons adopté le milieu de la tétée.

Nous avons donc opéré sur du lait venant d'être recueilli, provenant de nourrices saines dont les enfants étaient âgés de 3 à 15 jours. Chaque échantillon de lait, quand il s'agit de lait de Femme, correspond non à un mélange, mais à un seul individu, ce qui rend les variations plus sensibles.

DEUXIÈME TEMPS : DÉPROTÉINISATION.

Les deux modes de déprotéinisation, auxquels nous nous sommes arrêtés, constituent deux procédés excellents suivant le résultat que l'on veut obtenir. Nous verrons que le premier, moins rigoureux, permet le dosage du bloc total des glucides du lait, alors que les sels de mercure, plus sévères, tout en permettant le dosage du lactose, ont l'avantage, ou l'inconvénient selon le point de vue auquel on se place, de précipiter en outre quelques glucides contenus dans le lait.

A. — Déprotéinisation à l'acide silicotungstique.

Nous avons choisi l'acide silicotungstique car il ne laisse persister, comme l'a montré Pichon-Vandeuil [116], que très peu de matières azotées. Les filtrats obtenus sont clairs et peuvent se conserver fort longtemps comme nous avons tenu à nous en assurer : placé au frigidaire à + 3° un filtrat silicotungstique de déprotéinisation présente la même teneur en « sucre » après plusieurs mois.

RÉACTIF. — La solution d'acide silicotungstique se prépare très facilement (de préférence au moment de l'emploi) en dissolvant à froid 5 g. d'acide silicotungstique dans un peu d'eau distillée. Après totale dissolution on porte à 100 cm^3. Le réactif obtenu doit être incolore et parfaitement limpide, même après plusieurs jours. Ayant eu, avec des produits d'origines diverses, des solutions d'acide silicotungstique troubles ou développant à la longue une coloration bleue, nous avons

toujours utilisé, par la suite, pour nos dosages le produit cristallisé de Merck qui nous a donné toutes satisfactions. Cet acide silicotungstique, extrêmement soluble dans l'eau, répond à la formule :

$$SiO_2\ 12\ WO_3 + XH_2O\ ;\ P.M.\ 2844{,}06$$

il est exempt de chlorures, d'oxyde jaune, de sulfates, de nitrates et impuretés non volatiles.

MODE OPÉRATOIRE. — Le lait doit être mesuré avec le plus grand soin en utilisant une pipette cylindrique à un trait étalonnée. On doit laisser écouler le liquide très lentement, de cette manière aucune particule de matière grasse ne reste adhérente aux parois de la pipette, pour plus de sûreté on rince plusieurs fois avec de l'eau distillée. Dans un ballon jaugé de 25 cm³ on introduit :

5 cm³ de lait
3 cm³ d'eau distillée (environ)
5 cm³ de solution d'acide silicotungstique à 5 p. 100
Eau distillée q.s.p. 25 cm³

Après avoir agité énergiquement on laisse reposer 5 minutes et on filtre.

Nota. — La quantité d'acide silicotungstique indiquée ci-dessus (égales proportions de lait et de réactif) convient tout spécialement à la désalbumination du lait de Femme. Les autres laits, renfermant une bien plus grande proportion de caséine, nécessiteront la mise en œuvre d'une plus grande quantité de réactif. C'est ainsi que pour le lait de Vache, par exemple, nous obtenions :

avec 5 cm³ de lait + 5 cm³	de réactif	un filtrat toujours trouble
— 5 cm³ de lait + 6,25 cm³	—	un filtrat encore opalescent
— 5 cm³ de lait + 7,50 cm³	—	un filtrat clair mais renfermant un excès d'acide silicotungstique
— 5 cm³ de lait + 7 cm³	—	un filtrat immédiatement clair.

C'est donc cette dernière concentration qui sera la bonne, alors qu'elle est de 7,5 cm³ de réactif pour 5 cm³ pour le lait de Chèvre.

DILUTION. — On prélève 5 cm³ du filtrat précédent (correspondants à 1 cm³ de lait) que l'on porte à 30 cm³ avec de l'eau distillée (dilution au 1/30e). La solution ainsi diluée est utilisable directement pour les dosages soit par la méthode de Bertrand, soit par la méthode iodométrique.

B. — Déprotéinisation aux sels de mercure.

Pour nos dosages, nous avons presque toujours employé comparativement le nitrate et le sulfate mercurique. Avec Dumazert [14], nous avions songé à combiner, pour la déprotéinisation du sang, l'action du nitrate de mercure et celle de l'hydrate de cadmium, ce qui nous avait donné d'excellents résultats. Nous avons, par la suite, adapté cette technique au dosage du lactose dans le lait [15] ; c'est elle que nous exposerons tout d'abord :

a. — Déprotéinisation mercuro-cadmique.

PRINCIPE. — On effectue la déprotéinisation en combinant l'action du sel de mercure, désalbuminant par excellence, et de l'hydrate de cadmium. Ce dernier présente le double avantage de faciliter l'élimination de certains corps non glucidiques et d'entraîner, par précipitation, les traces de mercure en excès. La présence d'un très léger excès de cadmium dans les filtrats garantit contre toute variation de pH et, ces filtrats ne renfermant plus de mercure, le traitement par la poudre de cuivre devient inutile.

RÉACTIFS. — 2 sont nécessaires :

1° Réactif mercuro-cadmique :

100 cm³ de ce réactif correspondent à { 20 g. de nitrate mercurique / 1 g. de nitrate de cadmium

Il se prépare de la manière suivante : dans une capsule de porcelaine, on introduit 20 cm³ d'acide nitrique pur à 40° Baumé (d. = 1,39), on projette, par petites fractions, en remuant, 27 g. d'oxyde mercurique rouge (produit pur pour analyses). On ajoute environ 50 cm³ d'eau distillée et on porte à ébullition douce jusqu'à dissolution. Après refroidissement, l'on ajoute 2 g. de nitrate de cadmium, puis 100 cm³ d'eau distillée. On additionne alors d'une solution de soude environ 10 N (soude pure du sodium) jusqu'à obtention d'un précipité jaune permanent et, après repos, on porte à 200 cm³ avec de l'eau distillée. Après filtration le réactif est prêt à être utilisé.

2° Solution de soude.

Cette solution étant ajustée une fois pour toutes à un même réactif mercuro-cadmique peut servir pour un grand nombre de dosages, aussi doit-elle être préparée avec soin. Elle s'obtient ainsi :

a) Déterminer tout d'abord la quantité de soude nécessaire pour neutraliser exactement 2 cm³ du réactif mercuro-cadmique. Pour

cela, additionner 2 cm³ de ce réactif de 50 cm³ d'une solution de soude 0,1 N, porter à l'ébullition pendant une minute, puis titrer en retour (en présence de phénolphtaléine) l'excès de soude par SO_4H_2 0,1 N dont on versera un volume V (généralement voisin de 20 cm³). La neutralisation des 2 cm³ du réactif mercuro-cadmique serait donc réalisable par (50 - 20) cm³ de soude 0,1 N. Dans une désalbumination biologique, il est nécessaire d'employer une solution moins diluée et commode d'avoir une solution de soude dont 2 cm³ neutralisent 2 cm³ du réactif mercuro-cadmique. Le dosage précédent permet de *calculer* (sans la préparer) le titre T d'une solution de soude qui contiendrait, en 2 cm³, la valeur en soude représentée par (50 - V) cm³ de soude 0,1 N (généralement 29 à 30 cm³).

b) Etant donné que les protéines entraînent, dans leur précipitation, une certaine quantité de mercure et que nous voulons, d'autre part, laisser un léger excès de cadmium dans le filtrat pour assurer leur neutralité, on préparera, *pour l'usage*, une solution de soude d'un titre t inférieur à T

$$\text{soit } t = T - 0{,}25$$

La valeur 0,25 étant celle du facteur de correction fixe que nous avons déterminé à la suite de nombreux essais. En définitive, on a :

$$t = \frac{50 - V}{20} - 0{,}25$$

t doit être compris entre 1,20 et 1,30 N.

DÉSALBUMINATION. — Dans un petit bécher de 20 cm³, introduire :

1 cm³ de lait mesuré avec soin ;
1 cm³ d'eau distillée ;
1 cm³ de réactif mercuro-cadmique.

Bien agiter avec une petite baguette de verre, on additionne de 1 cm³ de soude de titre t ; agiter. Laisser reposer un quart d'heure. Filtrer sur un filtre sans cendres et recevoir dans un ballon jaugé de 30 cm³ le filtrat qui peut présenter à ce moment un léger louche. Laver le précipité à 3 reprises avec, chaque fois, 5 cm³ d'eau distillée froide (si l'on a constaté un léger trouble il disparaît à ce moment) ; amener le volume du filtrat à 30 cm³. C'est sur un prise d'essai appropriée de ce filtrat, qui doit être neutre et parfaitement limpide, que seront effectués les dosages.

b. — Déprotéinisation au nitrate mercurique.

RÉACTIFS. — Ils sont au nombre de deux :

1° Solution de nitrate mercurique à 20 p. 100.

Oxyde rouge mercurique.....	27 g.
NO_3H officinal pur.....	25 cm³ ou 33 g.
Eau distillée q. s. p.....	200 cm³

Dans une capsule de porcelaine, introduire 30 cm³ environ d'eau distillée ; verser en pluie l'oxyde en remuant pour éviter la formation de grumeaux. Ajouter assez rapidement une grande partie de l'acide (30 g. environ), puis 125 cm³ d'eau distillée. Chauffer doucement jusqu'à dissolution presque complète de l'oxyde. Ajouter alors le reste de l'acide, la solution se clarifie immédiatement. Neutraliser par addition d'une solution concentrée de soude (soude pure de sodium) jusqu'à obtention d'un précipité jaune permanent (on doit employer pour cela moins de 1 cm_3 de soude 10 N). Porter à 200 cm³ ; filtrer ; conserver en flacons jaunes à l'abri de la lumière.

2° Solution de soude normale.

La soude ne doit contenir aucune substance oxydable par l'iode. C'est pourquoi des soudes impures ayant eu une influence perturbatrice sur les dosages par la méthode iodométrique, nous avons toujours utilisé la soude de Merck (produit pur pour analyse) à la fois pour la préparation de la solution de soude N et pour la neutralisation des réactifs mercuriques.

DÉSALBUMINATION. — Dans un ballon jaugé de 30 cm³ mesurer successivement :

1 cm³ de lait
3 cm³ d'eau distillée (environ)
0,5 cm³ de réactif au nitrate mercurique

Il se forme, dès l'addition des premières gouttes de réactif, un précipité blanchâtre assez important. Bien mélanger, ajouter ensuite, goutte à goutte en agitant, la solution de soude N jusqu'à ce qu'une goutte du mélange, prélevée avec un fil de platine, colore en violet un papier de bromocrésol pourpre (*). La liqueur doit encore faire virer au rouge le papier de tournesol neutre sensible. Ce virage correspond à pH = 6,5 environ. La quantité de soude employée varie de 0,8 cm³ à 1 cm³ : elle est déterminée une fois pour toutes, par un essai à blanc, pour un même réactif mercurique employé. Compléter à 30 cm³ avec de l'eau distillée et, après 5 minutes de repos, filtrer en recueillant le liquide dans un petit erlenmeyer de 50 cm³.

DÉMERCURISATION. — Les filtrats ainsi obtenus renferment un excès de sel de mercure. Pour l'éliminer, il ne pouvait être question d'utiliser le zinc : une partie du filtrat devant servir à des dosages par la méthode iodométrique. Nous nous sommes adressés au cuivre. Après divers essais nous avons renoncé à utiliser la poudre de cuivre réduit, nous avons adopté la poudre de cuivre pour doreur, d'origine allemande. Le filtrat de déprotéinisation est additionné d'une petite quantité de cette poudre de cuivre. On bouche, puis on agite à différentes reprises et on laisse

(*) Tremper des bandes de papier filtre dans une solution de dibromocrésol-sulfone-phtaléine à 4 p. 1000 dans l'alcool à 60°, puis laisser sécher. Si le papier est de bonne qualité, il reste uniformément coloré en jaune.

en contact plusieurs heures jusqu'à démercurisation complète (ce dont on peut être assuré quand une goutte du filtrat déposée sur une lame de cuivre brillante ne donne aucune tache noire). On filtre à nouveau. Si l'opération a été bien conduite le filtrat est incolore ou très légèrement teinté de bleu. Le liquide est prêt pour les dosages.

Nota. — Nous avons indiqué déjà la nécessité d'une dilution convenable pour que le volume du précipité, supposé sec, soit considéré comme négligeable et qu'il n'y ait pas entraînement de sucre par ce précipité. Pour vérifier si nos conditions de dilution étaient suffisantes nous avons, sur un même lait, effectué les deux opérations suivantes : on opère comparativement sur deux prises d'essai de 1 cm³ de lait chacune. A chacun des deux échantillons on ajoute successivement et avec les précautions habituelles :

3 cm³ d'eau distillée (environ)
0,5 cm³ de solution de nitrate mercurique à 20 p. 100
q.s. (voisin de 1 cm³) de soude N jusqu'à neutralisation (pH=6,5)

Après 5 minutes de repos, le premier des deux échantillons est traité de la manière suivante : filtrer sur un filtre sans cendre en recevant le filtrat dans un ballon jaugé de 30 cm³. Laver le précipité à trois reprises avec 5 cm³ d'eau distillée froide à chaque reprise, puis amener le volume à 30 cm³ en complétant avec de l'eau distillée.

Le deuxième échantillon était porté à volume connu dans le ballon même de 30 cm³ où s'était effectué la précipitation ce qui englobait la masse du précipité.

Les deux échantillons étaient démercurisés à la poudre de cuivre et on effectuait les dosages. Dans les deux cas les résultats des dosages ont toujours été identiques.

c. — Déprotéinisation au sulfate mercurique.

RÉACTIFS. — On préparera les deux réactifs suivants :

1° Solution de sulfate mercurique.

Oxyde rouge mercurique..	21 g.
SO_4H_2 concentré	25 g.
Eau distillée q.s.p.....	200 cm³

Dans une capsule de porcelaine, délayer l'oxyde dans 30 cm³ d'eau de manière à obtenir une pâte sans grumeaux. Verser l'acide par petites portions, mais assez rapidement, en agitant soigneusement. Ajouter alors une cinquantaine de centimètres cubes d'eau distillée, laisser reposer et quand tout est dissous (ce qui doit demander un quart d'heure au maximum si l'oxyde est pur) compléter à 200 cm³ et filtrer. Ce réactif doit être tenu à l'abri de la lumière il se conserve moins longtemps que le nitrate mercurique.

2° Solution de soude normale

préparée également à partir de la soude pure du sodium de Merck.

MODE OPÉRATOIRE. — Introduire dans un ballon jaugé de 30 cm³

1 cm³ de lait
2 cm³ d'eau distillée (environ)
2 cm³ de solution de sulfate de mercure

Bien agiter ; ajouter goutte à goutte, en remuant après chaque addition, la solution de soude N jusqu'à neutralisation, ce que l'on vérifie en prélevant avec un fil de platine une goutte du mélange : elle doit colorer en violet un papier au bromocrésol pourpre (pH=6,5). Pour cette dernière opération on utilise environ 3,5 à 4 cm³ de soude N. Agiter, compléter à 30 cm³ avec de l'eau distillée. Après 5 minutes de repos, filtrer dans un Erlenmeyer de 50 cm³ et effectuer la démercurisation par la poudre de cuivre exactement comme avec le nitrate mercurique.

Ayant constaté, pour le lait, après étude comparative des procédés de déprotéinisation mercure-cadmium et mercure-cuivre, que les résultats étaient identiques nous avons eu recours le plus souvent à la seconde technique [**16**].

TROISIÈME TEMPS : DOSAGE.

Parmi toutes les méthodes utilisées pour le dosage du lactose dans le lait, nous en avons choisi deux types :

1° la méthode de G. Bertrand [**10**], dont la valeur est universellement reconnue, qui permet d'évaluer tous les sucres présents, aldéhydiques et cétoniques ; 2° la méthode iodométrique, car celle-ci ne dose que les sucres aldéhydiques.

Ainsi, dans le lait, qui, comme l'on sait, renferme un mélange de sucres, il sera permis de faire une discrimination parmi les glucides.

Nous avons complété par une étude polarimétrique.

A. — Méthode G. Bertrand.

Pour l'exposé de cette méthode, procédé classique, nous résumerons brièvement le principe et les indications générales au point de vue pratique.

PRINCIPE. La technique consiste dans l'emploi d'une solution alcaline d'oxyde de cuivre dont on fait bouillir un excès avec un volume connu de solution de sucre à doser. L'oxyde cuivreux précipité est ensuite évalué volumétriquement. Traité par une solution acide de sulfate ferrique, l'oxydule se dissout à l'état de sulfate de cuivre pendant qu'une proportion strictement correspondante de sel ferrique passe à l'état de sel ferreux :

$$Cu_2O + (SO_4)_3\,Fe_2 + SO_4H_2 = 2\,SO_4Cu + H_2O + 2\,SO_4Fe$$

On dose ce dernier volumétriquement par le permanganate de potassium ; l'on peut ainsi calculer la quantité de cuivre précipitée et en déduire la proportion de sucre en se servant de tables établies spécialement.

RÉACTIFS. — On préparera les réactifs suivants :

1° Liqueur cuivrique (A).

Sulfate de cuivre pur.....	40 g.
Eau distillée q.s.p.....	1000 cm³

par simple dissolution.

2° Liqueur sodique (B).

Sel de seignette	200 g.
Soude pure en plaques	150 g.
Eau distillée q.s.p.....	1000 cm³

3° Liqueur ferrique.

Sulfate ferrique	50 g.
Acide sulfurique	200 g.
Eau distillée q.s.p.....	1000 cm³

Il faut toujours veiller scrupuleusement à ce que la liqueur ferrique ne réduise pas le permanganate de potassium. Dès l'addition d'une goutte de ce dernier un changement de teinte appréciable doit apparaître. Sinon on verserait un peu de la solution de permanganate dans le réactif ferrique jusqu'à ce que ce résultat soit atteint.

4° Liqueur permanganique (à 2,50 g. par litre).

1 cm³ de cette solution correspond à 5 mg. de cuivre. Pour des raisons de commodité dans l'observation du virage nous avons substitué cette concentration à celle indiquée par G. Bertrand. Cette solution doit être préparée avec soin, à partir de permanganate de potassium pur, et rigoureusement étalonnée vis-à-vis de l'oxalate d'ammoniaque. Pour ce titrage on pèse avec précaution, à la balance de précision, 0,125 g. d'oxalate d'ammoniaque pur que l'on introduit dans une fiole conique avec 100 cm³ environ d'eau distillée et 2 cm³ de SO_4H_2 pur. Il y a formation d'acide oxalique que l'on titre à chaud (vers 60°) par la solution de permanganate de potassium à vérifier, dont on doit employer une quantité très voisine de 22 cm³.

MODE OPÉRATOIRE. — Nous n'avons pas à insister ici sur les détails de cette technique : on mesure avec précision 20 cm³ de la solution sucrée à doser (*) (pour les dosages de lait tels que nous les avons effectués, on prélève 20 cm³ du filtrat de déprotéinisation

(*) Pour un bon dosage il est préférable que la quantité de sucre renfermée dans la prise d'essai soit comprise entre 20 mg. et 80 mg. Si la quantité convenable de sucre est contenue dans un volume moindre de solution on doit compléter les 20 cm³ avec de l'eau distillée, car il est nécessaire que le volume soit constant (Bertrand).

dilué, au 1/30, ce qui correspond aux 2/3 de 1 cm^3 de lait). On ajoute alors successivement : 20 cm^3 de liqueur A, 20 cm^3 de liqueur B, on chauffe à l'ébullition que l'on maintient très exactement 3 minutes en évitant une ébullition trop vive. L'oxydule produit, il est indispensable de le séparer du liquide surnageant (*). Après avoir laissé se déposer l'oxydule on filtre donc le liquide surnageant sur un filtre spécial dont G. Bertrand lui-même a minutieusement détaillé la préparation. Il faut, dans cette opération, entraîner le moins possible d'oxydule sur le filtre. Après lavage à l'eau distillée *bouillie* on dissout le précipité dans une quantité convenable de la solution de sulfate ferrique et, après lavage, on titre par le permanganate de potassium. Le virage du vert au rose est extrêmement net par addition d'une seule goutte de permanganate si l'on a la précaution d'ajouter le permanganate centimètre cube par centimètre cube pour commencer, puis goutte à goutte pour finir, mais en opérant rapidement et surtout sans interruption.

CALCUL. — G. Bertrand a établi des tables indiquant la correspondance entre les poids de cuivre et ceux de sucre.

B. — Méthode iodométrique.

Dans les méthodes cuproalcalines on utilise la réduction de l'oxyde cuprique qui est corrélative de l'oxydation du sucre. Mais la réaction de l'oxydation est complexe ; on en connaît mal les stades et les produits qui prennent naissance (celui qui paraît le mieux déterminé est l'acide tartronique). Les variations de ce processus avec les conditions expérimentales et la non proportionnalité des quantités de cuivre réduit au sucre dosé, astreignent à l'emploi de tables, dressées dans des conditions expérimentales bien définies.

Ainsi une méthode basée sur une réaction précise et facile à écrire est plus rationnelle, ce qui semble le cas des méthodes iodométriques.

PRINCIPE. — Quand on fait agir l'iode sur un aldose en présence d'alcalinisants divers : borate de soude (Romijn), soude (Blond et Llyod [18], Willstätter et Schudel [162], Macleod et Robison), carbonate de soude (Bougault), phosphate disodique et soude (Colin et Liévin, Dumazert), la fonc-

(*) Il est, en effet, facile de se rendre compte que les produits d'oxydation qui restent en solution agissent fortement sur le permanganate : « quand après réduction d'une liqueur cuproalcaline par un sucre et précipitation de l'oxydule on sépare par décantation la solution bleue qui surnage, on peut constater que cette solution fortement acidifiée et partiellement décolorée par SO_3H_2 consomme beaucoup de permanganate alors que le réactif cuproalcalin pur, traité de même n'en consomme pas » (A. Baudouin [6]).

tion aldéhyde est transformée en carboxyle et les aldoses en acides aldobioniques correspondants. La réaction se schématise comme suit :

$$R - C\begin{matrix}O\\H\end{matrix} + I_2 + H_2O = R - COOH + 2\,HI$$

C'est là du moins la réaction principale car elle s'accompagne de réactions secondaires consistant en l'oxydation lente des fonctions alcooliques du sucre réducteur, mais qui ne s'opposent pas à ce que l'action de l'iode sur le glucose, par exemple, en milieu alcalin, ne puisse être prise pour base d'une méthode de dosage du glucose et d'une façon générale des sucres aldéhydiques (Bougault).

Pour réaliser d'une façon complète l'oxydation on fait agir l'iode en milieu alcalin (soude ou carbonate de soude). Ce n'est pas l'iode lui-même qui agit en oxydant, mais bien l'hypoiodite et l'iodate qui prennent naissance selon les équations suivantes :

$$I_2 + 2\,NaOH = IONa + H_2O + NaI$$
$$3\,I_2 + 6\,NaOH = IO_3Na + 3\,H_2O + 5\,NaI$$

En ajoutant, au moment du titrage, un acide en quantité suffisante, on provoque, comme le montrent les réactions suivantes, la libération totale de l'iode qui s'est combiné avec l'agent alcalinisant :

$$IOH + HI = I_2 + H_2O$$
$$IO_3H + 5\,HI = 3\,I_2 + 3\,H_2O$$

Ces équations indiquent que le pouvoir oxydant du réactif iode plus alcali, ou « potentiel oxydant » de Bougault, dépend de la quantité d'iode fixée par l'alcali. Bougault a démontré que le « potentiel oxydant » varie avec la nature de l'agent alcalin. La température également a une influence sur le « potentiel oxydant » de l'ensemble « réactif + alcali », mais il y a une température optima qu'il s'agit de déterminer.

Il ressort de ceci qu'il faut concilier les trois facteurs : la température, le temps et le degré d'alcalinité, ce à quoi se sont attachés de nombreux auteurs.

TRAVAUX ANTÉRIEURS. — Romijn [132], après avoir essayé un certain nombre de corps susceptibles de fournir une liqueur alcaline tels que : carbonate, bicarbonate de potasse, etc..., s'est arrêté à l'emploi de borate de soude. Mais l'iode, réagissant sur le borate dissocié en présence de l'eau, donne un hypoiodite qui ne tarde pas à se transformer en

iodate et iodure. L'oxydation doit se faire à basse température et, comme il est impossible d'empêcher cette réaction de se produire, il faudra provoquer, lors du dosage, la décomposition de l'iodate et de l'iodure par addition d'acide chlorhydrique. Sans cette précaution, l'iode passé à l'état d'iodate et d'iodure serait considéré comme ayant servi à l'oxydation du sucre.

Brachin [26], reprenant ces expériences, au lieu d'opérer comme Romijn avec des solutions N/10 d'hyposulfite et d'iode, préfère employer une solution d'iode à 10 g. par litre et une solution d'hyposulfite équivalente, ce qui évite les calculs : 1 cm³ d'hyposulfite correspondant à 0,01 d'iode. A la température de 30°, dix-huit heures sont nécessaires pour que la réaction soit totale ; à 20°, il faut au moins 24 heures. Il obtient des résultats satisfaisants avec les proportions suivantes de lactose hydraté, borate, iode et eau :

Solution de borate à 1 p. 25	30 cm³
Solution sucrée à 1 p. 100	20 cm³
Solution d'iode à 1 p. 100	50 cm³
Eau	100 cm³

Pour un dosage de lactose hydraté où la théorie réclame une absorption d'iode de 35,2 mg., il trouve pour l'iode absorbé 36 mg. Pour un mélange de 2/10 de lactose hydraté et de 8/10 de glucose-galactose, il obtient comme quantité d'iode absorbé 63,5 alors que la théorie en exigerait 63,4 mg.

Mais si Romijn, puis Brachin, ont utilisé les premiers l'iode en milieu alcalin pour les dosages des sucres aldéhydiques, c'est Bougault [25] qui, en 1917, a fixé les conditions qui devaient faire de la méthode iodométrique une technique rapide et précise. Il a souligné l'importance du degré d'alcalinité du milieu (ce qui l'amena à faire choix du carbonate de soude), de la durée de la réaction et de la quantité d'iode à mettre en jeu. Au carbonate de soude, employé par Bougault, Colin et Liévin [31] substituèrent un mélange de phosphate disodique et de soude ; Willstätter et Shudel [162], puis Auerbach et Bodlander [3] préconisèrent l'emploi d'alcali caustique dans des conditions bien déterminées. Willstätter et Shudel précisèrent que pour obtenir une réaction quantitative, il faut :

1° que la quantité d'iode ajoutée soit deux fois la quantité exigée par la théorie ;

2° que la quantité d'alcali soit une fois et demie celle de l'iode ;

3° que la réaction d'oxydation soit totale en 15 à 20 minutes.

Dans ces conditions, les cétoses et le saccharose ne subiraient aucune oxydation de la part de l'iode, et la méthode serait spécifique des aldoses.

Hilda Mary Judd [79] constate qu'avec la méthode de Colin et Liévin et celle de Willstätter et Shudel, un poids défini et constant d'iode réagit toujours avec un poids donné de glucose. Ce poids d'iode ne serait affecté ni par des changements dans la quantité d'alcali présent, ni par la présence d'autres sucres dans la solution.

Behre, Cajori, appliquant la méthode de Bougault (carbonate de soude), constatent aussi l'inactivité des cétoses vis-à-vis de l'iode. Kolthoff [87], utilisant la technique de Willstätter et Shudel (alcali caustique), confirme les résultats de ces auteurs et ceux de Baker et Hulton [4], mais conservent une correction de — 1 p. 100 en présence de saccharose et de fructose. De plus, il estime qu'avec la méthode de Willstätter et Schudel, la durée de l'oxydation peut être réduite à 5 minutes, ainsi que Baker et Hulton l'avaient déjà indiqué.

Une faible activité du lévulose et du saccharose est également reconnue par Bruhns, Auerbach et Bodlander.

Pauchard [114] pense remédier à certains des inconvénients constatés en opérant à basse température, en présence de carbonate de soude, mais la réaction demande alors deux heures et demie.

En résumé, la réaction simple et bien définie dont nous avons parlé, qui est à la base de la méthode de Bougault, présente un intérêt très grand. Les auteurs s'accordent pour reconnaître à la technique iodométrique de dosage des aldoses une valeur réelle de précision et de spécificité. Mais elle doit être adaptée pour des liqueurs particulières. Aussi les détails opératoires suggérés par les auteurs constituent-ils parfois des perfectionnements très importants.

Cette méthode est d'autre part très avantageuse : elle ne nécessite aucun appareil particulier et n'emploie que des réactifs courants dans les laboratoires, elle se présente donc favorablement aux analystes. Cependant, comme elle ne s'applique qu'aux seuls sucres aldéhydiques, elle n'est pas susceptible de la même généralisation que les méthodes basées sur la réduction des sels cupriques. C'est un inconvénient, mais aussi,

à certains égards, un grand avantage. Il importe toutefois d'observer que cette méthode est appliquable dans les seuls liquides où n'existent nulles substances oxydables par l'iode autres que le sucre à doser. De là une restriction singulière de son usage en chimie physiologique où son emploi nécessite une élimination complète de toutes les substances oxydables par l'iode comme les protides, leurs produits de dégradation, les composés uriques, etc.

Toutes les techniques, exposées précédemment, constituent des macro-méthodes. La première application en *microanalyse* de la méthode de Bougault a été réalisée par Perrier [115] pour des solutions d'aldose de 0,1 à 0,5 p. 100. Macleod et Robison [98], utilisant soit la soude caustique, soit le carbonate de soude, adaptent le dosage iodométrique à des quantités voisines de 1 à 3 ou 4 mg. des aldoses suivants : glucose, galactose, maltose, lactose, glucose monophosphate. Ils comparent en opérant identiquement avec du fructose, du saccharose, des fructoses monophosphates et diphosphates. Avec le carbonate de soude, en proportion convenable (0,2 ou 0,4 cm^3 de carbonate de soude à 5 p. 100), l'oxydation de 1 mg. de glucose est complète en 30 minutes à 20° ; 2 mg. de glucose sont oxydés jusqu'à 98 p. 100, mais avec de plus grandes quantités les résultats sont irréguliers. Les dosages montrent que le fructose n'est oxydable que sur une très petite échelle seulement : 0,2 p. 100 « lying close the limits of titration errors by this method » comme le font remarquer les auteurs.

H. Bierry, Gouzon et Magnan [13] appliquent, pour la première fois, la méthode iodométrique au dosage du sucre du sang. Ils emploient comme agent alcalinisant le carbonate de soude (cristallisé à 15 g. p. 1000 ou anhydre à 7,5 g. p. 1000) et indiquent les proportions d'iode et d'alcali à utiliser pour doser de 1 à 4 mg. de glucose.

Dumazert [37] étudie le microdosage des aldoses en présence de phosphate disodique pour des quantités de sucre comprises entre 0,1 et 0,3 mg. de glucose et applique sa technique au sang.

Enfin, avec Dumazert [15] *nous avons adapté, pour la première fois, la méthode iodométrique à la microanalyse du lait* avec des résultats satisfaisants. Nous allons en exposer le mode opératoire :

RÉACTIFS. — Les réactifs suivants sont nécessaires :

1° Solution de carbonate de soude.

Nous avons montré toute l'importance du réactif alcalinisant dans les dosages iodométriques. Nous employions une solution de carbonate de soude à 7,50 g. de carbonate de soude anhydre pour 1000 cm^3.

2° Solution d'iode.

Il est très difficile d'assurer la conservation des solutions d'iode (ou d'hyposulfite) 0,01 N ou 0,005 N. Le plus simple est de les refaire, pour chaque série de dosages, par dilution des solutions 0,1 N.

3° Solution d'hyposulfite.

L'exactitude du titre de la solution d'hyposulfite est essentielle dans les dosages à l'iode. On préparera donc une solution d'hyposulfite 0,1 N en prenant comme étalon une solution 0,05 N de biodate de potassium $(IO_3)_2KH$ à 3,2496 g. par litre (Shaffer et Hartmann) ou mieux une solution de bichromate de potassium à 4,9083 g. par litre (W. C. Vosburgh). Ces solutions correspondent volume à volume à la solution d'hyposulfite 0,1 N et sont inaltérables. On vérifie, en outre, la correspondance avec la solution d'iode.

Vérification du titre d'une solution d'hyposulfite par le bichromate de potasse.

Pour préparer rapidement la solution de bichromate, on pulvérise 7 à 8 g. de sel *pur* que l'on chauffe dans une capsule de platine. On porte au dessicateur, on pèse le poids indiqué que l'on dissout dans l'eau distillée. Pour le dosage, on mesure dans un grand Erlenmeyer :

Iodure de potassium incolore	1 à 2 g.
Eau distillée	5 cm^3 (environ)
Acide chlorhydrique pur à 20 p. 100 (en volume)	5 cm^3 (environ)
Solution de bichromate	10 cm^3 (exactement mesurés)

On mélange, puis après une demi minute environ, on dilue le tout à 400-500 cm^3 et on verse l'hyposulfite jusqu'à décoloration jaune pâle. Puis on termine en présence d'un indicateur : l'apparition de la teinte vert aigue marine marque la fin du virage.

Pratiquement, la solution d'hyposulfite 0,1 N se conserve indéfiniment si on a la précaution de la tenir en flacons soigneusement bouchés et d'ajouter un peu de borax (2 g. par 1000 cm^3) au moment de la préparation. La solution 0,005 N est préparée extemporanément par dilution. Si l'on voulait directement vérifier le titre des solutions 0,005 N, il faudrait donner la préférence à la méthode à l'iodate, car la libération totale de l'iode de l'iodure de potassium par CrO_3 n'est rapidement complète qu'en solutions concentrées.

Vérification du titre d'une solution d'hyposulfite par l'iodate de potassium.

En milieu acide le mélange iodate + iodure libère de l'iode selon la réaction suivante :

$$3\ SO_4H_2 + 5\ IK + IO_3K \longrightarrow 6\ I + 3\ SO_4K_2 + 3\ H_2O$$

On place l'hyposulfite dans la burette et on verse goutte à goutte dans un mélange formé de :

IK	1 g.
IO_3K à 5 p. 100 ..	5 cm³
SO_4H_2 0.1 N	10 cm³ (exactement mesurés)

Lorsqu'on a versé environ 9 cm³ d'hyposulfite, on ajoute le réactif indicateur et on verse jusqu'à décoloration.

Remarque. — Si le mélange IO_3K et IK devient jaune avant toute addition d'acide, décolorer par l'hyposulfite en présence de réactif de Tromsdorff, puis ajouter alors l acide et titrer exactement.

4° Solution d'acide chlorhydrique.

Préparer une solution de HCl 2,5 N.

5° Indicateur de virage. — Réactif de Tromsdorff, modifié par Boettger.

Le réactif de Tromsdorff est une solution à l'iodure de zinc amidonné qui se prépare comme suit :

Chlorure de zinc	20 g.
Eau distillée	100 cm³

Faire dissoudre et porter à l'ébullition, ajouter peu à peu au liquide bouillant 5 g. d'amidon préalablement délayés dans un peu d'eau distillée froide, ajouter au liquide refroidi 2 g. d'iodure de zinc. Quand tout est dissous on complète à 1000 cm³ avec de l'eau distillée.

La substitution de l iodure de cadmium à l'iodure de zinc, substitution préconisée par Boettger, rend le réactif peut-être plus sensible encore. Pour le préparer on dissout :

Amidon soluble	2,50	g.
Iodure de cadmium	1,50	g.
Chlorure de sodium	10	g.
Eau distillée q.s.p.....	500	cm³

Ce réactif est ajouté à raison de quelques gouttes, vers la fin du dosage. La solution d'hyposulfite 0,005 N est versée au moyen d'une burette graduée en 1/20° de cm³ et munie d'un bec assez effilé pour donner quatre gouttes par 1/20° de cm³. Grâce au réactif de Tromsdorff-Boettger la sensibilité du virage est telle que, à ce moment, la décoloration est nettement obtenue par addition de une ou deux gouttes d'hyposulfite. Il est nécessaire d'avoir une précision de cet ordre, à la lecture, pour les dosages à l'iode.

MODE OPÉRATOIRE. — Dans un flacon en verre blanc, bouché à l'émeri, on introduit *avec une pipette de précision*, une quantité

de filtrat de déprotéinisation correspondant à 1/15e de cm³ de lait (soit pour les dilutions que nous avons indiquées 2 cm³ de filtrat). On complète à 10 cm³ avec de l'eau distillée. On neutralise avec quelques gouttes (en général 10 à 12) de la solution de carbonate de sodium anhydre à 7,50 g. p. 1000 jusqu'à virage au rose d'un papier au rouge de phénol (il est capital pour un bon dosage que cette neutralisation soit très soigneusement vérifiée). Puis 1 cm³ de cette même solution carbonatée, et enfin 10 cm³ d'une solution d'iode 0,01 N. Préparer de même, pour l'essai à blanc, un flacon témoin dans lequel le volume du filtrat est remplacé par un égal volume d'eau distillée. Après agitation, laisser en repos, pendant trente minutes, à la température du laboratoire. Il est donc ainsi possible en préparant les essais (ou témoins) de 10 minutes en minutes de réaliser des séries de dosages en un temps minimum.

Quand le temps de réaction (30 minutes) est écoulé, acidifier avec 2,5 cm³ d'une solution de HCl 2,5 N (acidifier quelques minutes à peine avant le dosage). Titrer l'excès d'iode par la solution d'hyposulfite 0,005 N. Terminer le dosage en présence du réactif de Tromsdorff-Boettger.

CALCUL DES RÉSULTATS. — Si N représente le nombre de centimètres cubes d'hyposulfite 0,005 N versés pour le titrage du témoin et n celui relatif à l'essai réel, la teneur en sucre, exprimée en biose (lactose), par litre de lait est donnée : en

$$\text{Lactose anhydre par : } (N - n) \times 0{,}855 \times 15$$
$$\text{Lactose hydraté par : } (N - n) \times 0{,}9 \times 15$$

Le lactose ne renferme qu'une fonction aldéhydique terminale comme le glucose, il s'oxydera pour donner l'acide lactobionique et pour cela 360 de lactose hydraté absorberont 254 d'iode. Après interversion totale du lactose on aurait un mélange formé à parties égales de glucose et de galactose : pour 360 de ce mélange il existera 2 fonctions aldéhydiques et pour en produire la transformation en acide gluconique et acide galactonique il faudra 508 d'iode.

Faisant appel comme test d'exactitude vis-à-vis de la méthode iodométrique, à la méthode de vérification dite des quantités ajoutées (dont nous avons déjà parlé) nous avons additionné des échantillons de lait de quantités connues (pesées à la balance de précision) de lactose pur. Les dosages effectués nous ont permis de retrouver ce sucre dans le filtrat à moins de 2 p. 100 près, ce qui est la précision même de la méthode iodométrique employée.

Addition de lactose au lait

Teneur initiale du lait en lactose : 46,15 g. (en lactose hydraté p. 1000).

Lactose ajouté	Lactose calculé	Lactose dosé	Lactose retrouvé	Erreur p. 100	
				Rapportée à la quantité ajoutée	Rapportée à la quantité totale
—	—	—	—	—	—
2,50	48,65	48,6	2,45	— 2	— 0,1
5	51,15	51,05	4,90	— 2	— 0,2
7	53,15	53,10	6,95	— 0,7	— 0,1
6	52,15	52,20	6,05	+ 0,8	+ 0,1
8	54,15	54	7,85	— 1,9	— 0.25

C. — Méthode polarimétrique.

Pour la recherche quantitative du lactose par la méthode optique, l'obtention d'une liqueur limpide et incolore est indispensable. Un dosage rigoureux nécessite donc la séparation complète des substances opacifiantes ou actives, c'est-à-dire du beurre, du phosphate de chaux et des matières protéiques. La précipitation de ces dernières entraînant toujours mécaniquement les deux premiers principes, tous les procédés reviennent à une désalbumination aussi complète que possible. Il est également nécessaire d'éliminer les substances étrangères capables d'imiter ou de troubler les réactions du lactose.

Les sels de mercure constituent, dans ce cas, le meilleur désalbuminant et, depuis Wiley (1884), Denigès (1891), etc., la plupart des auteurs en font usage. Mais, dans le lait de Femme, il existe une substance lévogyre que les sels de mercure n'éliminent pas. Par suite, si l'on examine au polarimètre le filtrat désalbuminé d'un lait de Femme, on trouve une déviation dextrogyre inférieure à celle que faisait prévoir la quantité de lactose dosée par les méthodes réductrices. Cette anomalie sera discutée plus loin.

Nous avons dû, pour diverses raisons, faire des dosages optiques comparatifs du lait désalbuminé, soit par l'acide silicotungstique, soit par le nitrate mercurique. Les résultats ainsi obtenus et leur discussion seront exposés à la fin de ce chapitre. Voici le mode opératoire :

MODE OPERATOIRE. — Dans un ballon jaugé de 100 cm³ introduire 50 cm³ de lait soigneusement mesurés, puis 25 cm³ d'acide silicotungstique à 10 p. 100 (les filtrats devant être dilués le moins possible cette concentration est substituée, dans ce cas seulement

mais sans inconvénient, à celle précédemment indiquée). Après avoir vigoureusement agité le mélange, compléter à 100 cm³ et filtrer. Soit filtrat A le filtrat ainsi obtenu.

a. Pour l'examen polarimétrique du filtrat silicotungstique, l'on prélève 25 cm³ du filtrat A que l'on porte à 50 cm³ avec de l'eau distillée et on observe la déviation en utilisant un tube de 40 cm., la source de lumière était fournie par un arc au sodium.

b. Un deuxième filtrat de déprotéinisation était ensuite préparé de la manière suivante : dans un ballon de 50 cm³, on traite 25 cm³ du filtrat A par 6,25 cm³ de solution de nitrate mercurique à 20 p. 100. Après agitation, on neutralise de la manière habituelle (aux environs de pH=6,5 : ce qui nécessite environ 1 cm³ de solution de soude 10 N et 2,5 cm³ de solution de soude N) ; on complète à 50 cm³ et on filtre. Le filtrat ainsi obtenu, très clair, de même dilution que le précédent, est examiné immédiatement au polarimètre, dans un tube doublé de verre, sans qu'il soit besoin de démercuriser. La poudre de zinc aurait en outre l'inconvénient de développer une coloration bleue avec l'acide silicotungstique.

c. A titre comparatif, des dosages étaient effectués par les méthodes habituelles (méthode de Bertrand, méthode iodométrique) sur le même filtrat de déprotéinisation. En tenant compte que 2 cm³ du filtrat A correspondent à 1 cm³ de lait, il est facile de se placer dans la marge des prises d'essai accoutumées.

EXPOSÉ ET DISCUSSION DES RÉSULTATS. LAIT DE FEMME.

Les dosages ont été effectués sur plus de 100 échantillons de lait de Femme, chacun de ces échantillons correspondant non à un mélange mais à un lait individuel recueilli avec toutes les précautions déjà indiquées. Il s'agit d'échantillons tous prélevés pendant la période qui s'étend entre le troisième et le douzième jour qui suit l'accouchement.

Pour éviter de longues et fastidieuses colonnes de chiffres dans l'exposé de ce travail, nous avons préféré fragmenter les tableaux et ne donner chaque fois qu'une douzaine de résultats environ à titre de référence ; le numérotage des échantillons de lait permettra, en outre, de repérer, si besoin est, un même lait dans les divers tableaux.

I. — *DÉPROTÉINISATION PAR L'ACIDE SILICOTUNGSTIQUE.*

Sur un même filtrat silicotungstique, la teneur en sucre, exprimée en grammes de lactose anhydre rapportée à 1000 cm^3 de lait, est différente suivant que le dosage est effectué par la liqueur cuproalcaline ou par la méthode iodométrique. Les chiffres obtenus avec cette dernière technique étant les plus bas pour le lait de Femme (Tableau I).

Cette discordance entre les dosages de sucre par la méthode de Bertrand et par la méthode iodométrique est due, comme nous le verrons, à la présence, dans le lait de Femme, de glucides autres que le lactose. Les chiffres, au contraire, concordent, dans la marge des erreurs expérimentales, quand ces sucres ne sont pas présents dans le lait (cas des échantillons de lait de Femme n° 30, 59, 76, 52).

Dans le lait de Vache, dont il sera question par la suite, les dosages par les 2 méthodes sont concordants ; dans le lait de Chèvre, pour un même filtrat silicotungstique, les chiffres trouvés par la méthode iodométrique sont toujours légèrement supérieurs à ceux fournis par le procédé de Bertrand.

TABLEAU I. — *Déprotéinisation du lait de Femme par l'acide silicotungstique à 5 p. 100.*

(Résultats exprimés en g. de lactose anhydre par 1000 cm³ de lait).

Référence	Dosage par le procédé de BERTRAND	Dosage iodométrique	Différence entre les deux dosages
54	56,47	53,30	— 3,17
56	60,12	57,40	— 2,72
57	62,11	57,71	— 4,40
58	64,19	62,27	— 1,92
65	60,12	55,14	— 4,98
67	70,11	64,78	— 5,33
68	62,41	58,99	— 3,42
25	61,84	58,9	— 2,94
27	63,58	62,20	— 1,38
28	62,41	57,07	— 5,34

II. — *DÉPROTÉINISATION PAR LES SELS DE MERCURE.*

Dans une seconde série de dosages, nous avons étudié la déprotéinisation du lait sous l'action des sels de mercure : nitrate mercurique et sulfate mercurique. Dans chacun de ces deux cas les sucres étaient ensuite dosés comparativement, dans les filtrats, par la méthode iodométrique et par le procédé de BERTRAND. Les résultats obtenus sont exposés dans le tableau II.

Par la lecture de ce tableau, on peut constater que, si l'on effectue une déprotéinisation du lait de Femme par les sels mercuriques, qu'il s'agisse du nitrate ou du sulfate, les chiffres trouvés par iodométrie ou réduction sont très voisins. Toutefois, on doit noter que, d'une manière générale, la teneur en sucre, obtenue par le procédé de BERTRAND est légèrement inférieure à celle fournie par le procédé iodométrique.

TABLEAU II. - *Déprotéinisation du lait de Femme par les sels de mercure.*

(Résultats exprimés en g. de lactose anhydre par 1000 cm³ de lait).

N° de référence	Nitrate mercurique			Sulfate mercurique		
	Dosage iodométrique	Dosage par le procédé de BERTRAND	Différence entre les 2 dosages	Dosage iodométrique	Dosage par le procédé de BERTRAND	Différence entre les 2 dosages
29	66,7	65,29	— 1,41	65,40	64,87	— 0,53
60	55,14	55,05	— 0,09	58,35	55,05	— 3,30
61	60,28	59,55	— 0,73	60,92	59,55	— 1,37
62	62,84	62,11	— 0,73	60,92	63,30	+ 2,38
63	55,60	55,62	+ 0,02	55,79	55,05	— 0,74
64	53,45	53,89	+ 0,44	—	54,46	—
65	55,79	55,62	— 0,17	56,43	57,33	+ 0,90
66	54,50	54,16	— 0,34	55,79	60,69	+ 4,90
28	59,63	56,47	— 3,16	58,60	59,55	+ 0,95
39	63,48	60,97	— 2,51	64,12	60,69	— 3,43
49	64,12	62,70	— 1,42	62,84	63,30	+ 0,46
72	64,12	63,87	— 0,25	64,12	63	— 1,12
83	48,73	45,46	— 3,27	—	—	—
86	62,84	62,70	— 0,14	—	—	—
98	68,60	65,74	— 2,86	—	—	—

III. — *COMPARAISON ENTRE LES TROIS MODES DE DÉPROTÉINISATION.*

Des dosages comparatifs avec les deux méthodes (cuproalcaline et iodométrique) ont été faits sur les trois filtrats (filtrat silicotungstique et filtrats mercuriques : nitrate et sulfate) obtenus à partir d'un même lait.

A. — MÉTHODE IODOMÉTRIQUE : Les résultats obtenus avec cette méthode à partir des trois filtrats sont, en général, assez voisins, comme le montre le tableau III.

B. — MÉTHODE DE BERTRAND : Par contre, si on utilise cette dernière technique, il n'y a plus concordance : les filtrats mercuriques présentent très généralement (96 cas sur 100 étudiés) une teneur en sucre moins élevée que le filtrat silicotungstique (tableau III *bis*).

TABLEAU III. — *Dosage par la méthode iodométrique.*
(Résultats exprimés en g. de lactose anhydre par 1000 cm³ de lait).

Référence	Déprotéinisation du lait		
	par l'acide silicotungstique	par le nitrate mercurique	par le sulfate mercurique
25	58,9	60,28	60,92
27	62,20	62,20	63,48
28	57,07	60,28	60,92
54	53,30	56,43	56,43
69	61,56	64,12	64,77
61	60,28	60,28	60,92

TABLEAU III *bis.* — *Dosages par la méthode de* BERTRAND.
(Résultats exprimés en g. de lactose anhydre par 1000 cm³ de lait).

Référence	Déprotéinisation du lait		
	par l'acide silicotungstique	par le nitrate mercurique	par le sulfate mercurique
25	61,84	57	58,12
27	63,58	59,55	59,82
28	62,41	57,58	57,58
54	56,47	53,62	53,37
69	64,72	60,69	60,97
61	64,17	59,55	59,55

IV. — *DÉPROTÉINISATION MERCURIQUE DU FILTRAT SILICOTUNGSTIQUE.*

Les filtrats mercuriques montrant une teneur plus basse en sucre que le filtrat silicotungstique correspondant, il devenait intéressant de connaître la cause de ce phénomène. Les sels de mercure éliminent-ils une substance réductrice présente dans le filtrat silicotungstique ? Nous avons jugé utile de vérifier cette hypothèse en pratiquant deux désalbuminations successives : une première est réalisée par l'acide silicotungstique, puis, sur ce premier filtrat, on en effectue une seconde par les sels de mercure.

Pour cela, on opère de la manière suivante :

1. Préparer un filtrat silicotungstique au 1/5e de la manière habituelle : à 5 cm³ de lait, mesurés avec soin, on ajoute (dans un ballon de 25 cm³) 3 cm³ d'eau distillée et 5 cm³ de solution d'acide silicotungstique à 5 p. 100, puis on complète à 25 cm³ avec de l'eau distillée et on filtre. De ce filtrat on prélève 3 fractions de 5 cm³.

Une première fraction (5 cm³) est portée à 30 cm³ avec de l'eau distillée (filtrat A).

2. Une seconde fraction (5 cm³) est placée dans un ballon jaugé de 30 cm³, additionnée de 0,5 cm³ de solution de nitrate mercurique à 20 p. 100. On neutralise (à pH = 6,5) par la soude N comme pour une déprotéinisation directe par les sels de mercure. On porte à 30 cm³, on filtre et on démercurise le filtrat par la poudre de cuivre de doreur (filtrat B').

3. Une troisième fraction (5 cm³) est traitée par 2 cm³ de solution de sulfate de mercure, neutralisée (pH = 6,5) par une solution de soude N. Après avoir complété à 30 cm³ on filtre et on démercurise par la poudre de cuivre (filtrat C').

4. A titre de contrôle, on désalbumine directement 1 cm³ du même lait par le nitrate mercurique (filtrat B) et 1 cm³ par le sulfate mercurique (filtrat C).

La teneur en sucre est estimée dans les 5 filtrats de déprotéinisation (provenant du même lait et ainsi amenés à une même dilution finale) par des dosages comparatifs effectués avec la méthode de Bertrand et la méthode iodométrique.

En traitant par les sels de mercure soit le lait directement, soit un filtrat silicotungstique de ce même lait, on obtient par la méthode de Bertrand des chiffres de sucre concordants. Ces chiffres sont inférieurs à ceux obtenus avec le lait ayant subi une déprotéinisation simple par l'acide silicotungstique. La méthode de Bertrand permet donc de bien mettre en évidence la présence, dans le lait, d'éléments autres que le lactose qui sont éliminés par les sels mercuriques. En effet, dans quelques cas très rares (4 sur 100), les deux filtrats mercuriques et le filtrat silicotungstique ont fourni le même chiffre de sucre réducteur par la méthode de Bertrand, ce qui autorise à conclure que ces corps perturbateurs ne sont pas toujours présents dans le lait et, dans le cas où ils sont absents, les dosages sur les trois filtrats (silicotungstique et mercuriques) donnent les mêmes chiffres quelle que soit la méthode utilisée (Bertrand ou iodométrique). Ces corps semblent donc bien la cause des divergences constatées.

Comparaison entre les divers modes de déprotéinisation.

TABLEAU IV. — *Dosages par le procédé de* BERTRAND.

(Résultats exprimés en g. de lactose anhydre par 1000 cm³ de lait).

Référence N°	Déprotéinisation du lait par action simple				Déprotéinisation du lait par action successive	
	de l'acide silico-tungstique	du nitrate mercurique	Différence	du sulfate mercurique	de l'acide silico-tungstique puis du nitrate mercurique	de l'acide silico-tungstique puis du sulfate mercurique
56	60,40	54,16	—6,24	55,05	54,16	55,38
60	59,25	55,05	—4,20	55,05	54,45	55,90
61	64,17	59,55	—4,62	59,55	60,12	60,97
62	64,45	62,11	—2,34	63,30	60,69	61,84
63	59,82	55,62	—4,20	55,05	55,90	56,19
64	59,25	53,89	—5,36	54,46	55,62	56,76
69	64,72	60,69	—4,03	60,97	60,97	61,84
	Filtrat A	Filtrat B		Filtrat C	Filtrat B'	Filtrat C'

TABLEAU IV *bis*. — *Dosages par la méthode iodométrique.*

(Résultats exprimés en g. de lactose anhydre par 1000 cm³ de lait).

Référence N°	Déprotéinisation du lait par action simple				Déprotéinisation du lait par action successive	
	de l'acide silico-tungstique	du nitrate mercurique	Différence	du sulfate mercurique	de l'acide silico-tungstique puis du nitrate mercurique	de l'acide silico-tungstique puis du sulfate mercurique
56	55,14	54,50	−0,64	55,79	55,79	55,79
60	55,14	55,14	0	58,35	55,79	56,45
61	60,28	60,28	0	60,92	57,60	58,35
62	60,28	62,84	+2,56	60,92	62,84	60,92
63	55,79	55,60	—0,19	55,79	56,45	56,45
64	53,45	53,45	0	—	55,14	55,14
69	61,56	64,12	+2,56	64,77	63,48	64,12
	Filtrat A	Filtrat B		Filtrat C	Filtrat B'	Filtrat C'

V. — *DOSAGE POLARIMÉTRIQUE DES DEUX FILTRATS DE DÉPROTÉINISATION.*

En 1880, ESBACH [38], dans un mémoire peu connu sur le dosage du lactose, fit remarquer que la matière sucrée des laits de Vache et de Chèvre paraissait identique en ce qui con-

cerne les propriétés optiques et réductrices. Par contre, le dosage du sucre dans les laits de Femme et d'Anesse, débarrassés de toute substance albuminoïde, conduisait à des chiffres bien différents selon que l'on employait pour ces analyses la liqueur de Fehling ou le saccharimètre.

Esbach précisait, en 1888 [39], que « le lait ne contient pas une seule et unique lactose : la lactose type, que l'on retire par cristallisation répétée du lait de Vache ; il y a, dans chaque lait, *un mélange de lactoses* dont les propriétés très différentes se révèlent avec évidence quand on étudie comparativement le lait de Vache, le plus régulièrement composé, et le lait de Femme qui est le plus irrégulièrement composé à ce point de vue ».

Bechamp [7] conclut également que le sucre de lait, principe commun aux 4 espèces qu'il a étudiées (Femme, Anesse, Chèvre, Vache), présente dans le lait de Femme certaines particularités.

Denigès [35] constate, comme Esbach, que « lorsqu'on analyse le lait de Femme on trouve, si l'on emploie la liqueur de Fehling, 70 à 75 g. par litre, et avec le polarimètre et les coefficients habituels des chiffres inférieurs de 10 à 12 g. par litre pour le lait de Femme. Pour les laits d'Anesse les différences, de sens inverse, atteignent 4 à 5 g. par litre ».

L'anomalie optique expliquée, selon Esbach, par un mélange de lactose est, pour Denigès, due au fait suivant. Dans les laits de Femme, Anesse, Jument et probablement de Chienne, le lactose est accompagné d'une substance (qu'il n'a pas réussi à isoler) active sur la lumière polarisée : lévogyre dans les laits de Femme et de Chienne, dextrogyre dans les deux autres laits. « Le corps lévogyre serait à la dose probable de 5 g. par litre pour le lait de Femme, le corps dextrogyre à la dose de 2 g. pour le lait d'Anesse ».

Ces substances sont sans action réductrice sur la liqueur cuproalcaline, non précipitables par les réactifs des albuminoïdes et ne paraissent pas de nature azotée. Leur activité optique disparaîtrait par action des acides dilués à 100-110°. La cristallisation des sérums (filtrats désalbuminés de lait) a pour résultat d'éliminer en grande partie ce composé lévogyre qui, plus soluble que le lactose, se concentre dans les eaux mères, de sorte que les propriétés de cette substance y sont, pour ainsi dire, exaltées.

Peut-être ce corps pourrait-il s'apparenter aux sacchari-

nes (*). Ces saccharines sont des lactones, c'est-à-dire des esters internes qui ne possèdent pas de groupement aldéhydique réducteur. Les para et métasaccharines sont lévogyres. Les recherches que nous avions entreprises à ce sujet ont dû être interrompues.

Pour Polonovski et Lespagnol [121] cette différence entre les dosages optiques et la valeur réductrice tiendrait simplement à la présence, à côté du lactose, d'un glucide légèrement lévogyre, beaucoup moins réducteur que le lactose, gynolactose, et d'un autre sucre un peu moins réducteur que le lactose et de faible pouvoir rotatoire dextrogyre, allolactose osides dont il a été parlé précédemment.

L'« indice de réduction », que l'on traduit généralement en lactose, se répartirait en fait entre l'oside principal (lactose) et les autres composés glucidiques.

La détermination polarimétrique faite sur un filtrat de lait de Femme ne peut conduire à des conclusions précises par suite de la présence en proportions variables et de plus difficiles à déterminer, de glucides lévogyres comme le gynolactose, faiblement dextrogyres comme l'allolactose et peut-être aussi de la substance lévogyre mise en évidence par Denigès.

Néanmoins, dans le cas qui nous occupe, il était intéressant d'effectuer des dosages comparatifs de glucides dans le lait de Femme, d'une part avec la méthode optique, d'autre part avec des méthodes chimiques différentes de celles utilisées par Denigès et Béchamp et plus précises.

A la suite de nos analyses, il ressort (tableau V) tout d'abord que si l'on détermine l'ordre de grandeur du soi-disant « indosé optique » (évalué arbitrairement comme lactose par différence entre le pouvoir réducteur et le pouvoir rotatoire d'un même filtrat mercurique) celui-ci oscille (**) entre 5 et 14 g. par litre.

On voit, de plus, que les deux filtrats (silicotungstique et mercurique) d'un même lait présentent une même déviation polarimétrique. Cette concordance entre les deux filtrats se retrouve même dans les cas très rares (voir par exemple échan-

(*) On sait qu'il se produit par action de la chaux sur le lactose, dans des conditions imparfaitement déterminées, un mélange d'isosaccharine, de métasaccharine et de parasaccharine.

(**) Nous tenons à faire remarquer que ces expériences ont été faites sur des laits individuels, fraîchement recueillis, de 3 à 12 jours. Denigès ne spécifie pas l'« âge du lait ». A cette période, rapprochée de l'accouchement, les glucides accompagnant le lactose peuvent être en quantité plus grande que dans les laits plus anciens.

tillon 76, tableau V) où le lait de Femme ne renferme pas la substance réductrice en question. Il est donc logique de penser que, sous sa forme originelle tout au moins, la substance, entraînée par les sels de mercure, n'a pas de pouvoir rotatoire ou un pouvoir rotatoire très faible.

TABLEAU V. — *Dosage polarimétrique des filtrats de déprotéinisation* (en g. de lactose anhydre par 1000 cm³).

Référence N°	Dosage iodométrique (a)	Dosage au Bertrand (b)	Dosage polarimétrique (c)	Différence (b— c)
		Filtrat silicotungstique		
70	58,9	63,87	54,64	— 9,23
71	—	56,19	47,12	— 9,07
72	61,56	65,74	55,68	—10,06
73	45,35	52,50	35,13	—17,37
74	64,12	67,60	52,24	—15,36
75	56,43	59,82	47,44	—12,38
76(exception)	62,20	62,70	48,70	—14
98	65,40	68,68	51,36	—17,32
		Action combinée de l'acide silicotungstique et du nitrate mercurique		
	(a')	(b')	(c')	(b'—c') (b—b')
70	61,56	60,97	54,24	— 6,73 —2,90
71	—	52,50	47,52	— 4,98 —3,69
72	63,48	63	54,61	— 8,39 —2,74
73	46	45,46	35,68	— 9,78 —7,04
74	67,33	63,87	52,24	—11,63 —3,73
75	57,71	56,47	46,56	— 9,91 —3,35
98	68,60	65,74	52,24	—13,50 —2,94
76(exception)	62,84	62,70	48,70	—14 0

VI. — *TABLEAU RÉCAPITULATIF DES RÉSULTATS.*

Pour terminer nous donnons, à titre de document, sous forme de tableau (tableau VI) les résultats d'analyses (méthode réductrice et méthode iodométrique) se rapportant à de nouveaux échantillons de lait ayant subi d'une part la désalbumination simple (acide silicotungstique), d'autre part la désalbumination double (action successive de l'acide silicotungstique, puis du nitrate mercurique).

Sur 100 laits de Femme, examinés individuellement, les analyses faites comparativement sur chaque échantillon après désalbumination simple, puis après désalbumination double, donnent dans 4 cas seulement (échantillons n°s 30, 59, 76, 52), des chiffres identiques, pour ces deux filtrats, à la fois par la méthode iodométrique et par la méthode de Bertrand. Pour tous les autres laits on constate toujours, en faisant usage de la méthode cuproalcaline, une teneur en glucides moindre dans les filtrats obtenus après double déprotéinisation. Les sels de mercure, sans toucher au lactose, éliminent donc une substance réductrice de nature glucidique qui, à de rares exceptions près, se trouve dans les divers laits de Femme. Cette substance glucidique est, comme nous le verrons, dissimulée dans un complexe et c'est seulement après rupture de ce complexe que, mise en liberté, elle devient dosable par l'iode.

En résumé, par iodométrie on ne dose, dans les 2 filtrats de déprotéinisation, que le seul lactose, indépendamment des substances glucidiques renfermées dans le complexe.

De ces substances glucidiques celles qui sont libérées du complexe dans les divers temps des opérations de dosage et deviennent dès lors réductrices, peuvent être déterminées par différence entre 2 dosages faits comparativement, par la méthode de Bertrand, sur le filtrat silicotungstique et le filtrat mercurique ; ce dernier ne renfermant plus que le seul lactose.

Les dosages iodométriques, pratiqués sur les deux filtrats (silicotungstique et mercurique) apportent un complément d'information directement pour le dosage du lactose et indirectement pour l'évaluation des glucides qui l'accompagnent. En effet, d'après ce tableau, on voit d'abord que les chiffres, exprimant la teneur en lactose déterminée soit par la méthode iodométrique, soit par la méthode de Bertrand, sur le filtrat mercurique, sont très voisins. Ensuite, le taux des substances glucidiques (autres que le lactose), déduit par différence entre les chiffres obtenus par la méthode de Bertrand sur le filtrat silicotungstique (glucides globaux) et sur le filtrat mercurique (lactose seul), se montre du même ordre de grandeur que celui déterminé par différence entre les résultats des dosages faits sur le seul filtrat silicotungstique par la méthode à l'iode (lactose seul) et par la méthode de Bertrand (glucides globaux). On a ainsi un contrôle et des points de recoupement apportés par les deux méthodes.

Ces substances glucidiques sont absentes des filtrats mercuriques, mais présentes dans les filtrats silicotungstiques où elles échappent néanmoins aux méthodes d'oxydation par l'iode. Ainsi, dans ces divers cas, on peut parler d'un « *indosé glucidique* » dont personne jusqu'ici n'a encore fait mention. Cet « *indosé glucidique* » qu'il est possible d'évaluer arbitrairement en lactose anhydre, se trouve, à part quelques cas très rares, dans le lait de Femme à la dose moyenne de 3,50 à 5,10 g. p. 1000 ; dans un cas exceptionnel il atteignait même 7,04 g. par litre.

TABLEAU VI. — *Tableau comparatif des deux modes de déprotéinisation.*

(Résultats exprimés en g. de lactose anhydre par 1000 cm³ de lait).

Echantillons N°s	Déprotéinisation du lait par acide silicotungstique seul			acide silicotungstique puis nitrate mercurique		Différence entre les 2 dosages iodométriques	Différence entre les 2 dosages au Bertrand
	Bertrand	Iode	Différence entre les 2 dosages	Bertrand	Iode		
32	64,19	59,9	— 4,29	59,55	60,92	+ 1,02	— 4,64
34	63	58,9	— 4,10	58,12	58,35	— 0,55	— 4,88
35	65,74	61,56	— 4,18	60,12	60,28	— 1,28	— 5,62
84	67,60	64,12	— 3,48	63,97	65,40	+ 1,28	— 3,63
85	59,82	56,43	— 3,39	56,47	57,71	+ 1,28	— 3,35
86	56,47	53,45	— 3,02	53,62	55,14	+ 1,69	— 2,85
87	68,68	65,40	— 3,28	65,74	68,60	+ 3,20	— 2,94
50	64,72	61,56	— 3,16	61,84	60,92	— 0,64	— 2,88
40	59,82	56,45	— 3,37	56,19	55,15	— 1,30	— 3,63
41	62,11	57,71	— 4,40	57	60,92	+ 3,21	— 5,11
42	60,12	57,40	— 2,72	56,47	57,71	+ 0,31	— 3,65
73	52,50	45,35	— 7,15	45,46	46	+ 0,65	— 7,04
4 exceptions sur 100 échantillons de lait.							
30	61,84	61,56	— 0,28	61,84	61,56	0	0
59	51,40	51,30	— 0,10	51,40	51,93	+ 0,63	0
76	62,70	62,20	— 0,50	62,70	62,84	+ 0,64	0
52	63,58	63,48	— 0,10	63	62,84	— 0,64	— 0,58

ÉTUDE DE LAITS AUTRES QUE LE LAIT DE FEMME.

Nous avons tenu à faire une étude comparative sur d'autres laits que celui de Femme et nous avons choisi, pour des raisons de commodité, le lait de Vache et le lait de Chèvre.

LAIT DE VACHE.

Nous n'avons pu opérer ici sur des laits individuels. Les analyses avaient été effectuées tout d'abord sur quatre laits « marchand » donc sur des mélanges de provenance inconnue. Les laits étaient traités et dosés dès réception : soumis à la déprotéinisation par l'acide silicotungstique (*) et, parallèlement, à la déprotéinisation mercurique, ils étaient dosés comparativement par la méthode iodométrique et la technique de Bertrand. Un examen polarimétrique complétait les dosages.

En présence des premiers résultats ainsi obtenus, exposés dans le tableau ci-contre (échantillons du groupe A, tableau VII), il nous a paru utile de faire des recherches sur d'autres laits de Vache, mélanges de lait également, mais dont nous connaissions cette fois et l'origine et les conditions rigoureuses de propreté et de pureté observées lors de la récolte (échantillons du groupe B).

On voit que, dans ces cas, le chiffre des glucides globaux, évalués par la méthode de Bertrand sur les divers filtrats de déprotéinisation d'un même lait est toujours supérieur dans le filtrat silicotungstique, dans le lait de Vache comme dans le lait de Femme. Il semble y avoir là également un « indosé glucidique » mais qui se montre dans le premier, beaucoup plus faible et surtout d'une constance remarquable. Evalué très arbitrairement en grammes de lactose anhydre, il est de l'ordre de 1,80 g. environ par litre de lait de Vache.

D'autre part, si l'on considère ce filtrat silicotungstique, la teneur en glucides est la même (aux erreurs expérimentales près) quelque soit la technique employée pour la détermination (méthode iodométrique ou Bertrand).

(*) Comme nous avons pu le vérifier, il est nécessaire ici d'employer une dose de désalbuminant plus grande que pour le lait de Femme (voir déprotéinisation à l'acide silicotungstique, mode opératoire).

TABLEAU VII. *Dosage du lactose dans le lait de Vache.*

(Résultats exprimés en g. de lactose anhydre par 1000 cm³ de lait).

	Déprotéinisation par l'acide silicotungstique				Déprotéinisation par le nitrate mercurique				Différence entre les 2 dosages par le procédé de Bertrand	Différence entre les 2 dosages iodométriques
	Dosage iodométrique (I)	Dosage par le procédé de Bertrand (B)	Différence entre les 2 dosages (I-B)	Dosage au polarimètre	Dosage iodométrique (I')	Dosage par le procédé de Bertrand (B')	Différence entre les 2 dosages (I'-B')	Dosage au polarimètre	(B-B')	
Groupe A	46,80	45,75	+1,05	47	49,9	42,40	+7,50	46	−3,35	+3,10
	48	47,40	+0,60	48,50	51,30	45,45	+5,85	46,50	−1,95	+3,30
	46,80	46,80	0	50	51,30	45,45	+5,85	48,50	−1,35	+4,50
	46,17	45,45	+0,72	47,58	47,40	43	+4,40	44,58	−2,45	+1,23
Groupe B	45,45	43,80	+1,65	—	46,17	42,40	+3,77	—	−1,40	+0,72
	46,80	44,57	+2,23	—	47,40	42,70	+4,70	—	−1,87	+0,60
	47,40	46,35	+1,05	47,52	48	44,62	+3,38	45,68	−1,73	+0,60
	45,45	46,05	−0,60	46,50	45,45	44,35	+1,10	44,58	−1,70	+0
	48,09	48,80	−0,71	50	49,35	47,40	+1,95	48,50	−1,40	+1,26
	45,45	44,90	+0,55	47	49,35	43,27	+6,08	44,16	−1,63	+3,90
	47,40	44,62	+2,78	46	48	43,27	+4,73	44,58	−1,35	+0,60

LAIT DE CHÈVRE.

Les analyses ont porté sur des laits individuels, récoltés en notre présence et provenant d'un troupeau de 9 chèvres.

On remarque, qu'ici encore, pour un même lait, la teneur en glucides (obtenue par la méthode de Bertrand) du filtrat silicotungstique est supérieure à celle du filtrat mercurique. L'« indosé glucidique » est plus élevé que pour le lait de Vache mais reste aussi d'une constance remarquable (exprimé en grammes de lactose anhydre, il est en général de 2,80 g. par litre de lait de Chèvre) bien qu'il s'agisse ici non plus d'un mélange de laits, mais d'échantillons individuels.

Mais, contrairement à ce qui a lieu pour le lait de Femme, le chiffre de glucides trouvé, par emploi de la méthode iodométrique, dans le filtrat silicotungstique est légèrement supérieur à celui obtenu par la méthode cuproalcaline. Si des éléments de nature glucidique se trouvent dans le lait de Chèvre ils sont donc en quantité moindre et surtout ne sont pas de même nature que ceux préexistant dans le lait de Femme. Remarquons que, contrairement aux laits de Femme, les laits de Vache et de Chèvre étudiés étaient des laits « stabilisés ».

TABLEAU VIII. — *Dosage du lactose dans le lait de Chèvre.*

Référence N°s	Déprotéinisation par l'acide silicotungstique			Déprotéinisation par le nitrate mercurique			Comparaison entre la déprotéinisation à l'acide silicotungstique et la déprotéinisation au nitrate mercurique	
	Dosage par le procédé de Bertrand	Dosage iodométrique	Dosage au polarimètre	Dosage par le procédé de Bertrand	Dosage iodométrique	Dosage au polarimètre	Différence entre les 2 dosages par le procédé de Bertrand	Différence entre les 2 dosages iodométriques
1	49,09	51,30	50,58	46,35	57,60	49,08	— 2,74	+ 6,30
2	46,05	48,00	50,00	43,56	53,45	48,00	— 2,49	+ 5,45
3	46,60	47,40	49,50	43,80	54,45	47,58	— 2,80	+ 7,05
4	44,89	46,80	47,00	42,70	49,35	46,50	— 2,19	+ 2,55
5	44,62	45,00	46,50	42,40	48,75	—	— 2,22	+ 3,75
6	49,09	49,90	50,00	46,60	53,10	48,50	— 2,49	+ 3,20
7	44,89	46,80	46,50	42,40	51,30	—	— 2,49	+ 4,50
8	45,18	46,80	47,00	42,70	50,70	—	— 2,48	+ 3,90
9	43,00	45,00	44,58	40,23	49,35	—	— 2,77	+ 4,35

Conclusions. — En résumé, un dosage de sucre dans le lait comporte une désalbumination préalable. L'agent utilisé a une importance considérable : nous avons vu que l'emploi de certains déprotéinants enlève une substance qui est de nature glucidique.

En conséquence, pour l'*évaluation globale des glucides du lait,* on emploiera l'acide silicotungstique et le dosage au Bertrand.

Si l'on désire une *analyse plus complète de ces glucides,* il faudra faire deux déprotéinisations du même lait : l'une simple avec l'acide silicotungstique, l'autre double (acide silicotungstique d'abord, puis sels mercuriques ensuite). Les dosages seront effectués comparativement sur les deux filtrats par les deux méthodes : cuproalcaline et iodométrique.

Les dosages chimiques sont nécessaires et suffisants, le dosage polarimétrique, par contre, ne peut apporter, pour une analyse de lait de Femme, qu'un complément d'information parfois intéressant.

CHAPITRE VI.

Variations physiologiques du lactose.

Les analyses montrent, avant et après l'accouchement, des différences marquées en ce qui concerne l'aspect physique et la composition de la sécrétion mammaire, entre les divers sujets, les primipares et les multipares. Chez celles-ci, le premier jour après la délivrance le volume de la sécrétion oscille entre 10 et 30 cm^3 et peut atteindre 90 cm^3 dès le deuxième jour. Chez les primipares, le volume est susceptible de subir de plus grandes variations encore. Quant à la sécrétion prénatale elle est généralement limitée à 2 ou 6 cm^3.

En tablant seulement sur la différence de quantité des 2 sécrétions, on pouvait penser que la sécrétion prénatale n'était qu'un lait plus concentré. Les examens comparatifs des divers composants prouvent qu'il n'en est rien. En effet, le poids des cendres, du Ca en particulier, croît à partir du 30 ^{e} jour qui précède la naissance jusqu'au 10^e jour qui la suit, tandis que le poids des protides décroît régulièrement pendant la même période de 10 jours qui suit l'accouchement. Ainsi la différence que présentent les deux sécrétions est le fait de l'activité sécrétrice de la glande, et non de variations d'un même liquide.

On sait également que le colostrum, le lait primitif, s'écartent par de nombreuses propriétés du lait « stabilisé ». Quelques recherches touchant les propriétés physiques de ces sécrétions, ont été réalisées, chez la Génisse et parfois chez la Femme, par Houdet (1894), Engel (1911). Woodmann et Hammond (1922), Asdell (1925) et plus récemment Widdows (1927) [**95, 159**].

Si l'on envisage la viscosité en particulier, la sécrétion prénatale peut se présenter sous trois formes : 1° d'un liquide aqueux de couleur beige contenant des globules graisseux qui se séparent parfois de la couche aqueuse, forme assez rare ;

2° d'un liquide opalescent d'aspect laiteux beaucoup plus visqueux que le précédent, c'est le cas le plus général ; 3° enfin d'une liqueur épaisse, jaunâtre, d'une viscosité rappelant parfois celle de la gélatine. Ces 3 types ont été observés aussi bien chez les primipares que chez les multipares pendant les 2 premiers mois de la grossesse, sans que paraisse exister de relation entre la viscosité et le stade de gestation. Une légère corrélation peut être établie entre l'aspect de la sécrétion et la composition chimique, tout au moins en ce qui concerne la teneur en lactose des divers laits. C'est ainsi que pour des laits de même âge : « clairs » ou « épais », les « épais » sont beaucoup plus riches en glucides que les « clairs ».

Disposant de méthodes plus précises que celles de nos devanciers et permettant les dosages sur de faibles quantités de lait, nous avons recherché les variations du lactose dans les sécrétions lactées depuis la période prénatale jusqu'au 15e jour de l'état puerpéral. Nous avons suivi ces variations chez 6 femmes dont 3 primipares.

Sur ces diverses sécrétions, après déprotéinisation par les sels mercuriques, des dosages comparatifs ont été exécutés avec la méthode de Bertrand et la méthode iodométrique. La faible quantité de sécrétion prénatale n'a pas permis une étude comparative plus poussée.

La teneur en lactose, faible pendant les derniers jours de la gravidité, marque le taux le plus bas au moment même de l'accouchement, puis augmente rapidement, de façon progressive, du 1er au 10e jour et se stabilise aux environs de 65 g. p. 1000 jusqu'à la fin de la lactation. Cette stabilisation est beaucoup plus rapide chez les multipares.

Nous donnons 2 exemples de dosages de lactose effectués avant pendant et après accouchement, le premier chez une primipare (P.), le second chez une multipare (M.).

(Résultats exprimés en g. de lactose anhydre p. 1000 cm³ de lait).

	1 jour avant	Pendant l'accouchement	Après l'accouchement						
	—	—	1er jour	2e jour	3e jour	4e jour	6e jour	12e jour	15e jour
P.	25	7	46,50	—	48,60	51,10	57,58	62,70	62,70
M.	30	9	46,80	51,10	52,50	—	58,50	57,58	58,50

Influence de divers facteurs. — Nous avons étudié, en outre, l'*influence de la phase de la tétée*, elle semble avoir peu d'importance, en général, pour la teneur en glucides. Néanmoins, dans nos expériences, nous avons, sauf indications spéciales, prélevé le lait au milieu de la tétée de l'enfant, ce qui nous assurait d'une composition plus régulière.

Contrairement aux autres constituants, aux lipides en particulier, le taux en glucides présente, chez une même nourrice, une grande fixité aux diverses heures de la journée, *le moment du prélèvement* n'a donc pas d'influence.

Lait chez les diabétiques. — On sait que, chez la Femme nourrice normale, devant une perturbation alimentaire ou autre, la glande mammaire répond non en présentant un trouble correspondant dans sa sécrétion, mais en diminuant le volume du lait élaboré.

Dans le diabète sucré où l'on constate l'apparition de glucose dans les diverses humeurs de l'organisme, la mamelle reste capable de sécréter le lactose. La glande possède encore le pouvoir d'empêcher le passage du glucose dans le lait, et son processus synthétique constitue un mécanisme efficace pour transformer en lactose tous les glucides apportés, comme nous l'avons vu dans un précédent chapitre.

Parfois certaines Femmes nourrices sécrètent un lait dont la teneur en glucides est fortement abaissée. Il s'agit de laits dits « toxiques », dont nous rapporterons un cas.

Laits dits « toxiques ». — Les auteurs s'accordent pour noter que généralement les laits dits « toxiques » (c'est-à-dire en réalité inaptes à l'alimentation de l'enfant) ont une teneur très faible en lactose. Widdows et ses collaboratrices [**157**] signalent que, dans certains cas pathologiques, la proportion de lactose tombe au-dessous de la normale. Paccard [**109**] eut l'occasion d'observer à la nourricerie départementale de Lyon le cas d'un nourrisson intoxiqué par le lait de sa mère. L'analyse bactériologique n'avait montré l'existence d'aucun germe pathogène, mais ce lait présentait une grande anomalie dans sa teneur en protides (26 à 28 g. p. 1000), en chlorures (jusqu'à 2,48 g. p. 1000) et en lactose (44 g. p. 1000).

Nous avons également noté le fait suivant. Le lait d'une nourrice, après son 6e accouchement comme du reste lors des précédents, ne pouvait suffire à assurer l'alimentation du nouveau-né. La teneur en lactose de ce lait était particulière-

ment faible : 45,50 g. p. 1000 au 10e jour, sans augmentation progressive notable du 3e au 10e jour. Par contre, lors d'une sécrétion normale profitable à l'enfant, nous n'avons jamais constaté d'anomalies aussi grandes dans les quantités de glucides.

Par sa précision et en même temps sa rapide facilité d'exécution, un simple dosage de lactose présente donc un grand intérêt pratique. Un lait doit, en effet, être équilibré pour les besoins de l'enfant auquel il est destiné.

En résumé un lait normal, provenant d'une nourrice saine, présente une teneur en glucides très stable, indépendante de la nourrice, de la phase de la tétée, du moment du prélèvement, et, même, si le lait est « stabilisé » (c'est-à-dire à partir du 10e ou 12e jour), de l'âge du lait.

CHAPITRE VII.

Mise en évidence d'un hydrate de carbone nouveau de structure moléculaire complexe.

La comparaison des résultats analytiques obtenus après déprotéinisation d'un lait avec l'acide silicotungstique d'une part, avec une solution mercurielle d'autre part, montre, comme nous l'avons mis en évidence dans le chapitre précédent, qu'une substance, titrant comme « sucre » dans le filtrat silicotungstique est éliminée lors de la précipitation par les sels de mercure et ne se retrouve plus dans le filtrat mercurique.

Mais le corps est-il de la nature des glucides ou non ? La première hypothèse qui vient à l'esprit est qu'il s'agit simplement d'un entraînement de lactose. Mais cette supposition simpliste a été rapidement abandonnée. En effet :

1. D'une part le nitrate mercurique, comme beaucoup d'auteurs l'ont constaté, n'entraîne dans le lait ni le lactose présent, ni le lactose surajouté en petites quantités puisqu'il permet de les retrouver dans le filtrat. De plus, il ne peut s'agir d'un entraînement mécanique de lactose par les albumines puisque le lait, débarrassé de ces albumines par un premier traitement à l'acide silicotungstique, se comportait, vis-à-vis des sels de mercure, comme le lait primitif.

2. Dans différents laits de Femme, ayant une teneur globale identique en glucides totaux, les analyses décèlent néanmoins des quantités variables de la substance réductrice éliminée. Il en existe en moyenne 3 à 4 g. (évalué en lactose anhydre) par litre, certains laits pouvant en présenter près de 7 g.

Quelques laits, exceptionnellement, n'en renferment pas ; dans ce cas les discordances entre tous les dosages disparaissent : on trouve le même chiffre réducteur par les méthodes

de Bertrand ou iodométrique avec l'un ou l'autre déprotéinant.

3. Enfin la façon différente dont se comportent les laits de Vache et de Chèvre au même point de vue analytique nous a engagé à rechercher si le lait de Femme ne renfermait pas un glucide particulier entraînable par les sels de mercure. Pour administrer la preuve définitive de la nature glucidique de cette substance il était de la plus haute importance de tenter son isolement par un procédé d'extraction qui, permettant des dosages ultérieurs, rendrait possible un essai d'identification.

Il était logique de penser que, la substance réductrice en question, entraînée par précipitation mercurielle du filtrat silicotungstique, pouvait être régénérée, par un traitement approprié, de sa combinaison mercurique. Voici en détails la méthode qui nous a semblé la mieux adaptée au but poursuivi.

Avant d'en commencer l'exposé, indiquons d'une manière générale que, pour chacun des échantillons indiqués dans le tableau final, l'extraction a été pratiquée sur 400 à 800 cm^3 de lait de Femme, quantités obtenues par le mélange de 3 ou 4 (au maximum 5) laits individuels recueillis avec toutes les précautions d'usage. Dans toutes les extractions, il s'agissait de lait prélevé 7 à 12 jours après la naissance de l'enfant.

OBTENTION DU LIQUIDE D'EXTRACTION.

Technique. — Le filtrat silicotungstique est additionné de sulfate mercurique, puis d'une solution de baryte jusqu'à pH = 6,5. Le complexe glucides-mercure ainsi obtenu est ensuite traité par H_2S et $Ba(OH)_2$ de manière à mettre les glucides en solution. Par l'emploi de la baryte on évite toute introduction de sels dans la solution de sucre.

PREMIER TEMPS : DÉSALBUMINATION PRIMITIVE.

Pour des raisons d'ordre pratique, le lait ne pouvait être obtenu que par petites quantités atteignant rarement 200 cm^3. Il était donc nécessaire de l'emmagasiner d'une façon qui assure une parfaite conservation du matériel et n'empêche point les opérations ultérieures. Le premier temps du traitement répond à ces conditions : le lait (une heure au plus tard après le prélèvement) est précipité par une solution d'acide silicotungstique (à 5 p. 100 dans l'eau dis-

tillée) à raison de 50 cm³ d'acide silicotungstique en solution pour 50 cm³ de lait. Après une vigoureuse agitation, on complète à 250 cm³ avec de l'eau distillée, on filtre sur un filtre en papier plissé. Le liquide recueilli (que nous appellerons par la suite filtrat silicotungstique au 1/5) est parfaitement limpide, neutre, incolore et, conservé au frigidaire à + 3°, peut se garder sans transformation pendant plusieurs mois (*).

DEUXIÈME TEMPS : PRÉCIPITATION.

Lorsqu'on a recueilli une quantité de filtrat correspondant à la proportion de lait jugée suffisante, on traite par le sulfate mercurique (obtenu à partir de l'oxyde rouge : nous avons donné sa préparation au chapitre de la déprotéinisation du lait) dans les proportions suivantes qui se sont montrées les plus favorables à une précipitation complète. Dans un grand verre à pied d'une contenance de 3 litres environ, on verse d'abord 500 cm³ de filtrat silicotungstique au 1/5, puis on ajoute, par petites portions, en remuant après chaque addition, 180 cm³ de la solution de sulfate mercurique. On neutralise, non avec la soude comme on le fait pour le dosage, mais avec une solution de baryte (soit pour les proportions ci-dessus environ 1200 cm³ d'une solution de baryte à 40 g. par litre, préparée à chaud, puis refroidie) en surveillant le virage au papier de bromocrésol pourpre qui doit se colorer en violet, ce qui donne un pH = 6,5 environ, le liquide laissant encore virer au rouge le papier de tournesol. Quand tous les réactifs ont été ajoutés on laisse en repos une nuit.

TROISIÈME TEMPS : ISOLEMENT DU PRÉCIPITÉ.

Le lendemain, on décante le liquide surnageant qui doit être limpide et on fait passer le précipité jaune obtenu sur un creuset de Gooch muni d'un double disque en papier et adapté à une trompe à vide. Après un temps assez court, le filtrat est parfaitement limpide et sur le creuset se dépose une sorte de gâteau que l'on lave très soigneusement à l'eau distillée froide en ayant soin de laisser écouler complètement, à chaque fois, les eaux de lavage. A la dernière reprise, on essore bien à fond jusqu'à ce que le gâteau se craquelle. On réunit les divers gâteaux, obtenus de la même manière, on délaye avec de l'eau distillée de façon à obtenir une pâte semi-liquide sans grumeaux que l'on introduit dans un grand ballon Pyrex.

(*) Ce fait nous a permis de noter une curieuse expérience de « grimpage ». Les parois d'un ballon de filtrat qui, inutilisé, était demeuré plus de cinq mois à la glacière, se sont couvertes d'une masse blanchâtre en quantité assez importante. Ce produit, recueilli, séché, se montre très nettement réducteur envers la liqueur cuproalcaline. Projeté sur le bloc Maquenne, il fond (fusion instantanée) à la même température qu'un échantillon de lactose pur. Il s'agissait donc d'une cristallisation de lactose.

QUATRIÈME TEMPS : DÉMERCURISATION.

On fait alors passer un courant de H_2S. L'acidité du mélange est suffisante pour permettre la formation du sulfure de mercure. On laisse agir H_2S pendant tout le temps nécessaire, c'est-à-dire jusqu'à ce qu'un peu de filtrat prélevé ne donne plus de précipité avec H_2S. A ce moment on bouche le flacon et on abandonne, pendant une nuit, le mélange qui demeure ainsi dans une atmosphère saturée de H_2S. On verse le contenu du ballon dans un grand verre à pied et, avec un agitateur, on homogénéise bien le mélange en faisant passer à nouveau H_2S s'il était nécessaire. On filtre et on lave très soigneusement à l'eau distillée chaude le précipité de sulfure en recueillant filtrat et eaux de lavage dans un grand ballon Pyrex muni d'une tubulure latérale. Le liquide obtenu est parfaitement clair et à peu près incolore. Il s'agit maintenant d'éliminer H_2S et pour celà le plus aisé est d'utiliser une pompe foulante électrique qui, en un quart d'heure au maximum, libère l'atmosphère du ballon de tout l'hydrogène sulfuré en excès.

Si les diverses opérations ont été bien conduites, on doit avoir à ce moment au maximum 1 litre de liquide pour un point de départ de 500 cm^3 de lait.

CINQUIÈME TEMPS : NEUTRALISATION.

Dans la liqueur — refroidie pour éviter l'isomérisation des sucres — on ajoute, par petites portions, une solution de baryte (*) jusqu'à léger excès, afin d'éliminer SO_4H_2, puis l'acide silicotungstique qui a été entraîné. Les sels de baryum sont enlevés, à leur tour, par filtration, les précipités étant soigneusement lavés à l'eau distillée. Dans le filtrat qui doit être obtenu clair et limpide (joint aux eaux de lavage) l'ion Ba^{++} est éliminé exactement de cette solution par SO_4H_2 2N. On concentre dans le vide à 60° environ. Dans cette concentration, le liquide bien neutre primitivement, devient acide. Il est nécessaire d'ajouter dans le liquide froid une solution de baryte de façon à rétablir un pH = 6,8, on filtre, puis on concentre à nouveau. On doit alors obtenir dans le ballon de concentration, environ 30-35 cm^3 d'un liquide neutre, limpide et à peine teinté en jaune paille (s'il était nécessaire, il faudrait alors ajouter CO_3Ba pur et centrifuger).

On verse ce liquide dans deux tubes de centrifugeuse équilibrés que l'on place dans la glace 1/2 heure environ. Il se dépose ainsi un précipité assez abondant. Après centrifugation, on verse sans perte le liquide de décantation dans un ballon étalon jaugé à 50 cm^3 en verre Pyrex, on complète à 50 cm^3 avec les eaux de lavage.

Ce liquide réduit nettement la liqueur cuproalcaline à chaud, il contient donc bien le corps que nous désirions isoler,

(*) Solution de baryte à 40 g. p. 1000 mise dans un flacon d'Oswald à l'abri du CO_2 de l'air.

mais n'y a-t-il pas eu perte de substance dans les diverses opérations finales ? Il n'en est rien comme le montre l'analyse des différents précipités formés au cours de l'opération :

1. *Le précipité, obtenu à 0°*, est mis dans l'alcool méthylique où il reste insoluble (dans la liqueur alcoolique il se développe une odeur rappelant celle de la pyridine). Conservé dans l'alcool, ce précipité se présente sous forme de lamelles transparentes assez semblables à de l'albumine, il n'est pas réducteur. Une parcelle de ce précipité, épuisée par l'eau bouillante, donne naissance à une masse gommeuse, élastique, analogue à du caoutchouc. Il sera fait état de cette substance particulière lorsque nous envisagerons la constitution du complexe.

2. *Les divers précipités de SO_4Ba* auraient pu, eux aussi, englober un peu de substance glucidique. Nous les avons réunis dans un ballon en les entraînant avec de l'eau distillée, le mélange est porté à l'ébullition. Après filtration, le liquide obtenu n'est pas précipitable par l'alcool et ne montre aucun pouvoir réducteur avec la liqueur cuproalcaline.

3. Lors de la neutralisation progressive par la *baryte* nous avions constaté à plusieurs reprises que *le tout dernier précipité obtenu* différait des précédents. Ceci était particulièrement net quand la quantité de solution de baryte, nécessaire pour la complète neutralisation, n'excédait par 30 cm^3, sinon ce précipité reste noyé dans la masse de SO_4Ba. Ce précipité légèrement gris beige, qui se dépose lentement, donne la réaction des phosphates (réactif molybdique — phosphate ammoniaco-magnésien — réaction de Denigès). Le dosage montre une teneur en phosphore (en P_2O_5) de 2 p. 100 environ.

La liqueur d'extraction, ainsi libérée des substances que nous venons d'indiquer, est portée à volume connu. Comme elle renferme l'« indosé glucidique », c'est sur elle qu'il convient d'effectuer les analyses qui vont suivre.

ÉTUDE DU LIQUIDE D'EXTRACTION.

I. — RÉACTIONS DE COLORATION.

La liqueur d'extraction est réductrice, de plus elle est active sur la lumière polarisée et nettement dextrogyre. Elle renferme donc très vraisemblablement des glucides. Tout d'abord il était nécessaire, afin de limiter le champ de ces recherches, de sou-

mettre cette liqueur à quelques essais d'identification (tests de coloration).

A. — Réactions générales.

Nous avons effectué en premier lieu les réactions suivantes : la *réaction de* Molisch (α naphtol et SO_4H_2) et la *réaction de* Tillmans et Philippi (orcine et SO_4H_2). Ces réactions qui sont très générales, mais en même temps d'une grande sensibilité, se sont montrées *positives*.

La *réaction de* Tillmans et Philippi a été modifiée par Sörensen et Haugaard.

On introduit dans un flacon conique :

1 cm³ d'une solution de sucre (0,004 mg. pour 1 cm³)
2 cm³ d'une solution d'orcine à 2 p. 100
15 cm³ de solution de SO_4H_2.

Cette solution de SO_4H_2 est préparée ainsi : 60 de SO_4H_2 pour 40 cm³ d'eau et titrée de façon à avoir 14,30 g. d'équivalent SO_4H_2 pour 100 g.

On chauffe le mélange pendant 10 - 15 ou 20 minutes.

Cette méthode colorimétrique permet non seulement l'identification, mais aussi le dosage d'oses présents en quantités minimes. On peut même, en ayant recours à la mesure de l'absorption au moyen du photomètre de Pulfrich et de filtres spéciaux, et, en se reportant à des courbes de base, établies pour chaque hexose, arriver à déterminer la constitution d'un polysaccharide. Des courbes d'étalonnage ont été dressées à cet effet par Sörensen et Haugaard.

B. — Réactions des pentoses.

Il importait ensuite de déterminer si l'on se trouvait en présence d'hexoses ou de pentoses. Pour caractériser ces derniers nous avons utilisé la *réaction classique à l'orcine* qui consiste à chauffer la solution en présence d'orcine et de HCl concentré (22° B), soit à l'ébullition, soit, comme le recommande Bertrand, en chauffant doucement vers 50°, ou encore en opérant avec le réactif de Bial (*).

Les résultats ayant été *négatifs* on pouvait donc éliminer les pentoses.

Mais se trouvait-on en présence de cétoses ou d'aldoses ?

(*) Réactif de Bial : 1,0 g. orcine, 500 cm³ HCl (1,15), XXV gouttes de $FeCl_3$ à 29 p. 100. On porte 2 cm³ de ce réactif à l'ébullition, on éloigne de la flamme, puis on ajoute goutte à goutte la solution sucrée.

C. — Réactions des cétoses.

La réaction de Seliwanoff classique (résorcine + HCl) ayant été, avec notre solution, faiblement positive, nous avons essayé la réaction de Denigès.

Réaction de Denigès. — Denigès a montré que les polyalcools primaires et cétoniques en général, la dihydroxyacétone, sont susceptibles, en milieu sulfurique, dans des conditions bien déterminées et en présence de certains phénols, de fournir des colorations d'une grande intensité. C'est ainsi que la résorcine fournit une coloration rouge sang, la codéine une coloration vert bleu. Cette observation a été ensuite généralisée par Denigès qui a démontré que tous les corps de formule CH_2OH.....—CO—CH_2OH sont transformés, sous l'action de SO_4H_2, en une nouvelle molécule de la forme CH^3.....—CO—CH_3.

Mode opératoire : O. Bailly conseille, pour l'essai à la résorcine sulfurique, d'introduire dans un petit tube à essai :

0,5 cm³ de la liqueur à essayer
0,1 cm³ de solution alcoolique de résorcine à 5 p. 100
2 cm³ de SO_4H_2.

On porte au bain-marie bouillant pendant 2 minutes et immédiatement il se développe une coloration rouge groseille.

Cette réaction s'est montrée positive, la coloration (plutôt grenadine que groseille) obtenue avec notre solution étant voisine de celle fournie par une solution de lévulose pur. Mais comme il s'agit ici d'un mélange de sucres, cette réaction ne pouvait être considérée que comme une simple indication.

D. — Recherche des amino-hexoses.

Nous avons tenu à rechercher les amino-hexoses (glusosamine, chondrosamine). La glucosamine est facilement décelable et dosable par une réaction colorée : elle se condense avec l'acétylacétone, en milieu alcalin, pour donner un dérivé pyrrolique qui fournit une coloration rouge avec le réactif d'Ehrlich en solution alcoolochlorhydrique.

Cette réaction a été *négative* de même que la suivante, car nous avions songé également à rechercher ces aminohexoses sous leur forme N-acétyl. On sait que la molécule de N-acétylglucosamine possède un groupe réducteur aldéhydique qui, en présence d'alcali, se change en forme énolique et, par élimination d'eau, donne naissance à un anneau hétérocyclique et à un dérivé oxazol. La condensation de ce dernier avec la

p. diméthylaminobenzaldéhyde en milieu acide (acétique) provoque l'apparition d'une coloration pourpre (Zuckerkandl et Messiner-Klebermass, T. J. Morgan et L. Elson). Cette réaction est spécifique, elle permet, d'après Morgan et Elson (1934), Morgan (1936), de caractériser avec certitude les N-acétylglucosamines et de les doser.

E. — Recherche des acides uroniques.

L'absence de coloration avec la naphtorésorcine, en opérant suivant les indications de Tollens et Rorive ou avec la modification de Neuberg et Saneyoshi, a permis d'éliminer l'hypothèse de la présence d'acides uroniques.

La liqueur d'extraction renferme donc des glucides, qui ne sont ni des pentoses, ni des amino-hexoses.

II. — OBTENTION D'OSAZONES.

Deux questions se posent : s'agit-il d'un seul glucide ou d'un mélange ? Y a-t-il un oside hydrolysable ? Les dosages effectués avant et après hydrolyse ont indiqué une augmentation du pouvoir réducteur des solutions traitées par les acides à chaud. Ce premier point acquis, nous avons soumis les liqueurs, avant et après hydrolyse, à l'action de la phénylhydrazine de façon à obtenir des dérivés qui soient caractéristiques, si possible, des oses supposés présents. Les premiers essais ont montré qu'il s'agissait d'un mélange : de galactose, d'une part (déjà présent dans la liqueur avant hydrolyse), et d'un oside, d'autre part, se transformant, sous l'action des acides à chaud, en glucose et galactose. Une étude plus poussée des osazones obtenues s'imposait.

Avant d'entrer dans le détail, quelques précisions sont nécessaires sur la façon d'obtenir les osazones des glucides, envisagés ici, sur leur séparation, leur purification et leur identification.

Généralités sur les osazones. — Depuis les travaux d'Emil Fischer, on a très souvent recours à la méthode des osazones pour l'identification des sucres. On sait que tous les sucres réducteurs forment avec la phénylhydrazine, à chaud et en présence d'un excès d'acétate de phénylhydrazine, des combinaisons cristallisées, jaunes, de solubilités diverses, auxquelles on donne le nom d'osazones.

Deux molécules de base entrent en réaction avec une molé-

cule de sucre, il y a transformation de l'hydrazone d'abord formée qui perd les 2 atomes d'hydrogène d'une fonction alcoolique voisine de la fonction hydrazone, de telle sorte que cette fonction alcool devient cétone :

$$CH_2OH-(CHOH)_3-CHOH-CH=N-NHC_6H_5 \qquad \text{Hydrazone}$$

$$CH_2OH-(CHOH)_3-\overset{\overset{O}{\|}}{C}-CH=N-NHC_6H_5$$

L'hydrogène qui est ainsi mis en liberté ne se dégage pas, mais réagit sur la base en excès et dédouble la phénylhydrazine $C_6H_5NH-NH_2$: en aniline $C_6H_5NH_2$ et ammoniac NH_3. Comme on se trouve en présence d'un excès de phénylhydrazine, la fonction cétone se condense immédiatement avec une troisième molécule de base et on a formation d'un corps où les deux fonctions phénylhydrazone sont côte à côte : c'est l'osazone :

$$CH_2OH-(CHOH)_3-C.O\,|\,-CH=N-NHC_6H_5$$

$$+\ |\,H_2N-NHC_6H_5$$

$$\longrightarrow CH_2OH-(CHOH)_3-\overset{\overset{N-NHC_6H_5}{\|}}{C}-CH=N-NHC_6H_5 \qquad \text{Osazone}$$

Préparation des osazones. — Il est toutefois assez difficile d'obtenir à partir de certains oses et surtout de certains holosides, après leur extraction de liquides de l'organisme, des échantillons d'osazones qui soient corrects pour l'analyse. La question se complique encore, si on envisage la formation et l'isolement d'osazones prises au sein d'une liqueur renfermant un mélange de glucides. Il est cependant de toute nécessité que ces corps soient obtenus à l'état de pureté pour la détermination de leurs constantes, du point de fusion en particulier.

Des premiers essais nous ayant amené à envisager dans nos liqueurs la présence de galactose et d'un oside voisin du lactose, nous avons entrepris quelques recherches pour préciser tout d'abord les conditions d'isolement d'osazones à partir d'un mélange de glucose, galactose, lactose, puisque nous nous trouvions en présence d'un cas présentant avec le précédent quelque analogie. Il nous fallait, tout d'abord, déterminer les meilleures conditions d'expériences, afin de ne point gaspiller la petite quantité de liquide d'extraction que nous avions à notre disposition.

Il y a un certain nombre de précautions à prendre et, si ces conditions sont bien observées, cette méthode qualitative peut même devenir quantitative, ainsi que l'ont montré H. Bierry (1903-1911) et Brachin (1904). Ces auteurs eurent l'idée de caractériser et même de doser le lactose en présence de ses produits de dédoublement : glucose et galactose. Cette méthode repose sur le fait que la phényllactosazone est soluble dans l'eau bouillante (1 pour 80 environ), alors que la phénylglucosazone et la phénylgalactosazone y sont pratiquement insolubles. Il est nécessaire d'opérer toujours dans les mêmes conditions, par exemple sur un volume de solution sucrée contenant 1 p. 100 de lactose ou de ses produits de dédoublement.

Mode opératoire : on ajoute à la solution sucrée (1 p. 100), 2 cm³ de phénylhydrazine fraîchement distillée sous pression réduite, 2 cm³ d'acide acétique cristallisable, 2 g. d'acétate de soude cristallisée et q.s. d'eau distillée p. 100.

Le mélange est placé 1 heure 1/2 au bain-marie bouillant. Après un repos de 12-18 heures, les osazones, recueillies sur un filtre sans plis, sont lavées avec 50 cm³ d'eau distillée froide pour éliminer l'excès de phénylhydrazine. Le précipité est chassé avec un jet de pissette à l'aide de 150 cm³ d'eau chaude dans une fiole d'Erlenmeyer. Le tout est porté à l'ébullition. Les osazones insolubles, recueillies sur un filtre taré, sont ensuite lavées avec 50 cm³ d'eau bouillante pour éliminer les dernières traces de lactosazone. La pesée se fait après dessication à 110-112°.

Dans un mélange de glucose, galactose, lactose, la quantité globale d'osazones insolubles : glucosazones-galactosazones, est-elle proportionnelle à la quantité de glucose-galactose existant dans la solution ?

Voici un tableau où les poids des osazones, insolubles dans l'eau bouillante se rapportent à 1 g. de sucre total mis en expérience.

Mélange de sucres formé de		Poids des osazones insolubles dans l'eau bouillante
Lactose (hydraté)	Glucose-Galactose	
—	—	—
10/10	0	0 g.
9/10	1/10	0
8/10	2/10	0,07
7/10	3/10	0,15
6/10	4/10	0,215
5/10	5/10	0,30
4/10	6/10	0,34
3/10	7/10	0,425
2/10	8/10	0,48
1/10	9/10	0,55
0	10	0,63

On voit, tout d'abord, que les poids des osazones obtenus avec les différents termes d'une même série ne sont pas dans un rapport simple, et que, pour une proportion de galactose-glucose inférieure à 20 p. 100, on n'isole pas d'osazones insolubles ; celà tient à ce que la lactosazone entraîne en solution un peu de glucosazone et de galactosazone. A partir du moment où le mélange est formé à parties égales de glucose-galactose et de lactose, les poids d'osazones obtenus sont proportionnels à la quantité de glucose-galactose.

L'expérience montre, en outre, qu'il importe de mettre, pour un même poids d'oses, une quantité constante de phénylhydrazine.

Le tableau suivant :

Quantité de phénylhydrazine p. 1 g. de glucose-galactose	Poids d'osazones insolubles p. 1 g. de glucose-galactose
2 cm³	0,37 g.
4	0,68
6	0,90
8	0,96

fait ressortir que, même avec la proportion la plus élevée de phénylhydrazine, environ 8 fois le poids de sucre en expérience, la réaction n'est pas complète. Théoriquement, avec 2 g. de phénylhydrazine pour 1 g. d'hexoses, on devrait avoir 1,98 g. d'osazones. Si l'on cherche à augmenter la quantité de phénylhydrazine au-dessus de 2 cm³ par gramme d'hexoses, la masse des osazones qui se dépose après refroidissement a un aspect gélatineux et est très difficile à laver.

Par ce procédé, on peut déceler avec certitude, dans un mélange de lactose, glucose, galactose, une proportion de glucose-galactose égale à 20 p. 100. Au point de vue dosage, il n'est guère possible d'obtenir des poids d'osazones concordants à plus de 0,02 g. près. Toutefois, on peut se faire une idée assez exacte de l'importance des sucres présents en cherchant dans le tableau à combien de glucose-galactose correspond le poids d'osazones trouvé.

La présence dans nos liqueurs de galactose et d'un holoside avant hydrolyse, de glucose et de galactose après hydrolyse nous a incité à répéter les expériences précédentes. Nous avons entrepris un certain nombre de recherches qui nous ont permis de vérifier les données précédentes relatives à la formation des osazones du glucose, galactose, lactose en solution individuelle d'abord et dans un mélange ensuite. Nous avons

constaté que la galactosazone est plus soluble en présence de lactosazone que la glucosazone, par suite, dans une solution renfermant du lactose, le glucose peut être plus facilement mis en évidence que le galactose. Enfin, nous avons vu que le glucose, à son tour, est plus difficile à déceler en présence d'un mélange de galactose et de lactose que de lactose seul. Nous avions ainsi en mains une technique nous permettant, de façon sûre, d'identifier au lactose, ou au contraire de l'en différencier, l'oside de notre solution.

Caractérisation des osazones. — Les osazones se caractérisent par leurs propriétés : forme cristalline, solubilité, activité optique, point de fusion, composition. Nous limiterons cette étude aux osazones présentes dans nos liqueurs.

A. *Forme cristalline : Phénylglucosazone.* — La phénylglucosazone cristallise à chaud au bout d'un temps variable selon la concentration en glucose. Les cristaux de phénylglucosazone se présentent, à l'examen microscopique, en longues aiguilles d'une *couleur jaune verdâtre*, groupées en *branches de genêt.*

Le glucose, toutefois, ne peut être identifié par la seule glucosazone, car on obtient la même osazone avec les glucides suivants mis en réaction : *d*-glucose, *d*-mannose, *d*-fructose (cétose), *d*-glucosamine (aminohexose), isoglucosamine (*d*-fructosamine), les produits de condensation des trioses, aldéhyde glycérique et dihydroxyacétone (acrose).

La glucosazone, suivant la concentration en sucre, peut prendre des formes différentes : aiguilles isolées, minuscules branches de genêt, petits faisceaux. Ces dernières formes cristallines prennent naissance dans les liqueurs pauvres en sucre (moins de 1 p. 1000).

Phénylgalactosazone. — Selon la teneur en galactose des solutions mises en réactions, la phénylgalactosazone se forme à chaud ou seulement à froid. Elle prend l'aspect de *gros cristaux jaunes d'or*, larges lamelles tantôt isolées, tantôt groupées en rosaces, reconnaissables de suite avec un peu d'habitude.

Les *d*-galactose, *d*-talose, *d*-tagatose (cétose) donnent la même osazone.

Phényllactosazone. — L'osazone du lactose ne cristallise que dans les liqueurs abandonnées au refroidissement, après un temps plus ou moins long, selon la concentration en lac-

tose. Au microscope, l'osazone présente un aspect très spécial et constant : sphérules entourées d'un chevelu de filaments ressemblant à des oursins. La forme n'est constante que dans les liqueurs ayant une certaine concentration.

B. *Solubilité.* — La phénylglucosazone et la phénylgalactosazone, une fois débarrassées de toute trace de phénylhydrazine, sont très peu solubles dans l'eau bouillante ; elles sont également très peu solubles dans l'acétone au demi. On peut ainsi les séparer des osazones solubles, en particulier de la lactosazone et de la maltosazone, par purifications successives, en tenant compte que la présence d'une osazone soluble (lactosazone) favorise la dissolution d'une osazone peu soluble (H. Bierry [11]).

Pour la purification, on utilise : le benzène, l'éther, qui ne dissolvent pratiquement pas, à froid, les osazones. La glucosazone et la galactosazone sont peu solubles dans l'alcool méthylique à froid, alors qu'elles sont solubles dans l'alcool éthylique à 60° ou à 95°. L'acétate d'éthyle qui, également, ne dissout pas ces deux osazones pourra être employé pour leur purification.

La lactosazone est soluble dans l'eau à chaud, et à froid dans l'acétone étendue de son volume d'eau. Elle demande à être purifiée par de nombreuses cristallisations et traitement au benzène avant d'être desséchée dans le vide.

C. *Activité optique.* — Des indications utiles peuvent être tirées du sens du pouvoir rotatoire et des caractères de la mutarotation. Les osazones dissoutes dans un mélange de pyridine et d'alcool (Neuberg), (0,10 g. d'osazones dissous dans 4 cm^3 de pyridine et 6 cm^3 d'alcool) présentent le phénomène de la mutarotation, mais leur pouvoir rotatoire stable est constant. Pour certaines le pouvoir rotatoire stable est plus grand que le pouvoir rotatoire initial (xylosazone), pour d'autres c'est l'inverse (arabinosazones) Levene et La Forge.

L'osazone du *d*-glucose est lévogyre, celle du *d*-galactose est dextrogyre. Neuberg a décrit la lactosazone comme inactive dans la pyridine-alcool, en réalité ce composé présente une activité optique notable avec mutarotation (Winter). D'abord dextrogyre, elle devient lévogyre (Klager et Maurenbrecher, 1938).

D. *Point de fusion.* — Le point de fusion exact d'une osazone est une constante à déterminer en premier lieu ; cette déter-

mination doit être faite sur une osazone débarrassée de toutes impuretés.

Cette opération courante n'est pas si simple qu'on pourrait le croire. Dès le début, de nombreuses controverses se sont élevées parmi les auteurs qui se sont occupés de cette question. C'est ainsi que pour les glucosazones et galactosazones, dont nous avons à nous occuper, des chiffres divers ont été fournis :

Galactosazone	193 - 194°	E. Fischer.
	195°	Bergmann et Grafe.
	201°	Levene et La Forge.
	214°	Gabriel Bertrand.
Glucosazone.....	208°	Fischer.
	208°	Levene et La Forge.
	230 - 232°	Gabriel Bertrand.

Etant donné la notoriété des auteurs cités, les divergences ne peuvent être attribuées à des impuretés. Elles sont dues à la façon d'opérer : les auteurs américains et allemands utilisent le tube capillaire, les auteurs français le bloc de Maquenne.

Tube capillaire. — Emil Fischer [45] opère rapidemnet, il chauffe de telle façon que la température s'élève de 1° par deux ou trois secondes et il supprime la source de chaleur quand le corps commence à fondre. Si l'on chauffe la glucosazone pendant 1 minute à 195-200°, indique Fischer, la fusion avec décomposition se produit à 200°. La décomposition de la galactosazone commence vers 180°, alors que la fusion n'a lieu qu'à 194°. La plupart des osazones, remarque Fischer, fondent avec décomposition, le corps noircit et des gaz se dégagent. Il fait, en quelque sorte, le procès de cette manière de procéder.

Bloc Maquenne. — Une bonne précaution consiste à régler la source de chaleur de façon que la température du bloc monte de environ 1° par minute, et à projeter, de temps à autre, une petite quantité d'osazone sur le bloc jusqu'à ce que la fusion soit instantanée. On laisse alors refroidir le bloc de quelques degrés, et on répète l'essai, de minute en minute, pendant qu'on chauffe à nouveau très lentement le bloc. On a ainsi une bonne précision.

Fischer a montré que la chaleur altère facilement les osazones, ce qui a pour effet d'abaisser le point de fusion. C'est pourquoi la recherche du point de fusion instantané (G. Bertrand) au bloc Maquenne est bien préférable : elle conduit

à des chiffres notablement plus élevés en ce qui concerne la glucosazone et la galactosazone, car ces deux osazones fondent à une température supérieure à 200° et doivent subir longtemps l'action de la chaleur si l'on opère au tube capillaire.

Pour éviter, enfin, toute incertitude il est nécessaire d'opérer à la fois sur l'osazone à essayer et sur une osazone obtenue à partir du même sucre pur, les deux corps doivent fondre simultanément au bloc Maquenne. On peut aussi mélanger les deux osazones (osazone à essayer et osazone obtenue à partir du sucre pur), le point de fusion ne doit pas varier.

Point de fusion de la lactosazone. — E. Fischer, utilisant le tube capillaire, décrit pour la lactosazone non un point exact de fusion, mais un intervalle : 200-212°. Neuberg indique 200°. Winter (1931) qui fait usage également du tube capillaire, observe que la lactosazone se décompose vers 194° et fond à 198-200°. G. Bertrand constate que la lactosazone fond vers 200° au bloc Maquenne (fusion instantanée). L. Grimbert indique un chiffre plus élevé : 213°.

Si l'on prépare la lactosazone pure, en chauffant le lactose en présence de phénylhydrazine, d'acide acétique et d'acétate de soude (à dose double de celle de l'acide acétique), cette osazone fond bien vers 198-200°. C'est que l'acétate de soude présent fait reculer la concentration en ions H^+ de la liqueur et par suite empêche la formation de l'anhydride. Les acides dilués et la chaleur sont capables, en effet, de transformer la lactosazone en une quantité plus ou moins considérable de son anhydride. Cet anhydride est très peu soluble dans l'eau et fond à 224°.

Les anomalies constatées dans le point de fusion sont dues au mélange de lactosazone et d'anhydride.

Giberton [55] a montré qu'il suffit de chauffer pendant 1/2 heure à 160° quelques milligrammes de lactosazone sèche (P. F. = 200°), pour la transformer en anhydride fondant à 224-226° au bloc Maquenne. Ce phénomène serait caractéristique du lactose.

E. *Analyse élémentaire.* — L'analyse élémentaire complète est intéressante, mais le seul dosage d'azote peut être précieux quand il s'agit de distinguer l'osazone d'un triholoside ou d'un diholoside de l'osazone d'un monose.

Pour $C_{18}H_{22}O_4N_4$ ..... N = 15,6 p. 100
$C_{24}H_{32}O_9N_4$ ..... N = 10,7 p. 100
$C_{30}H_{42}O_{14}N_4$ ..... N = 8,2 p. 100

Obtention d'osazones à partir du liquide d'extraction.

A. — Avant hydrolyse.

Nous avons soumis les liquides d'extraction, avant et après hydrolyse, à l'action de la phénylhydrazine. Cette opération a été répétée sur un certain nombre de liqueurs provenant de laits différents de façon à se rendre compte si tous les divers laits renfermaient ou non les glucides envisagés.

Le liquide neutre, concentré de façon à avoir une teneur en sucre de 1 à 2 p. 100, teneur calculée d'après le pouvoir réducteur, est placé dans un tube Pyrex. On ajoute, petit à petit, la quantité convenable d'un mélange à parties égales de phénylhydrazine et d'acide acétique au demi, mélange préparé extemporanément. Après avoir placé le liquide au bain-marie bouillant pendant 5 minutes, on filtre à chaud de manière à avoir un liquide clair. Cette précaution permet d'éliminer du milieu la phénylhydrazine en excès qui, sans cela, aurait tendance à se réunir en gouttelettes huileuses. La phénylhydrazine éliminera les impuretés, par exemple les traces d'acide silicotungstique qui pourraient rester. La quantité de phénylhydrazine doit être calculée de façon qu'elle soit ajoutée dans les proportions indiquées plus haut. On filtre, la liqueur claire obtenue, additionnée d'acétate de soude cristallisé, est placée dans la glace pilée où on la laissera 24 heures. Aucune hydrazone ne s'étant formée dans ces conditions, il est permis de conclure à l'absence de mannose. On filtre à nouveau et on met le tube, renfermant le liquide, au bain-marie bouillant pendant 1 heure. Si la liqueur se trouble assez rapidement, la cristallisation nette des osazones ne s'effectue pas à l'ébullition ; cette cristallisation a lieu dès que la température du bain-marie baisse au-dessous de 80°. Pour obtenir de plus beaux cristaux, il est préférable de laisser refroidir très lentement le tube dans l'eau même du bain-marie après suppression de la source de chaleur.

Examen microscopique. — On observe une seule sorte d'osazone. Les osazones obtenues se présentent en larges lamelles, de couleur jaune or, tantôt isolées, tantôt groupées en rosaces, possédant tous les caractères microscopiques de la galactosazone.

Caractérisation des osazones. — On recueille sur un filtre mouillé, sans plis, le dépôt d'osazones obtenu. On le lave

d'abord deux fois à l'eau froide, puis on le remet en suspension dans un peu d'eau en s'aidant d'un jet de pissette et on reporte au bain-marie bouillant. Une partie seulement de ces osazones se dissout : celà tient à ce qu'il reste encore un excès de phénylhydrazine ; or, l'on sait que la galactosazone est un peu soluble dans ces conditions. En effet, dès que l'eau du bain-marie se refroidit, il se produit une cristallisation abondante. Mais à l'examen, on ne constate que *la présence de galactosazone* ; aucune osazone, pouvant faire penser à la présence de lactosazone, ne peut être décelée.

Purification des osazones. — Les galactosazones sont lavées à l'eau bouillante jusqu'à ce que le liquide passe incolore. On les introduit, en s'aidant d'un jet de pissette et en employant le moins d'eau possible, dans un tube Pyrex de petite centrifugeuse. On centrifuge, on décante l'eau, on égoutte. Le culot d'osazones est traité alors successivement par les réactifs suivants (en recueillant à chaque fois les liqueurs de lavage) et en brassant les osazones à l'aide d'un fil de platine : 4 lavages à l'acétate d'éthyle, 3 lavages à la benzine, 2 lavages à l'éther, 2 nouveaux lavages à l'acétate d'éthyle. On centrifuge une dernière fois les osazones demeurées insolubles dans tous ces traitements et on les dessèche dans le vide sur SO_4H_2, puis à l'étuve.

Point de fusion des osazones. — Le point de fusion choisi est celui de la fusion instantanée, déterminée au bloc Maquenne, selon les indications données précédemment. Les osazones obtenues fondaient au bloc Maquenne à 212°, soit à la même température que l'osazone préparée à partir de galactose pur et projetée simultanément sur le bloc. Le mélange des deux osazones ne faisait pas varier le point de fusion.

Essai d'obtention d'une autre osazone dans les divers solvants — Comme nous l'avions fait lors du traitement par l'eau, nous avons tenu à nous assurer si les divers solvants, servant à la purification de nos osazones, n'auraient pas dissous certaines osazones. Mais, par cristallisations fractionnées dans ces liquides, nous avons toujoure obtenu des osazones de même forme, plus petites généralement, mais bien cristallisées en rosaces à larges lamelles et de point de fusion identique. Il semble donc bien qu'il n'y ait qu'*une seule osazone : la galactosazone*.

CARACTÉRISATION DU GALACTOSE PAR OBTENTION DE LA MÉTHYLPHÉNYLHYDRAZONE.

Le galactose peut être décelé par formation d'acide mucique, mais cette réaction n'est pas strictement spécifique. On peut le caractériser par trois procédés : 1° à l'état de benzylphénylhydrazone comme l'a indiqué Otto Ruff [133] ou 2° comme o-tolylhydrazone [150] et enfin 3° sous forme de méthylphénylhydrazone [163]. Cette dernière méthode étant la plus classique et la plus sûre, nous lui avons donné la préférence.

Pour cela, nous avons soumis une partie de notre solution à l'action de la méthylphénylhydrazine en opérant de la manière suivante :

La solution est additionnée de 3 volumes d'alcool éthylique à 96° et laissée 5 jours à 15° dans un flacon bien bouché. On centrifuge pour éliminer le dépôt, puis on distille dans le vide le liquide alcoolique. Le liquide restant est à nouveau additionné de 3 volumes d'alcool et on répète l'opération. La liqueur finale est additionnée de méthylphénylhydrazine asymétrique (en proportion telle qu'il y ait deux fois la quantité donnée par le calcul) et d'une petite quantité d'acide acétique. On laisse 6 à 7 heures à la température ordinaire en agitant doucement de temps en temps, on place ensuite à la glacière pendant 15 heures. Après une nouvelle cristallisation dans l'alcool éthylique, l'hydrazone se présente sous forme d'écailles blanches d'aspect nacré ; ses constantes sont celles de la galactose-méthylphénylhydrazone anhydre.

Votocek [152] indique un P. F. = 190° pour la galactose-méthylphénylhydrazone anhydre et 185-187° pour l'hydrazone monohydratée (obtenue à partir d'une solution aqueuse de galactose). Pour éviter toute incertitude, nous avons opéré parallèlement sur le produit à essayer et sur une hydrazone provenant du galactose pur. Les deux produits fondaient simultanément au bloc Maquenne.

B. — Après hydrolyse.

Sous l'influence des acides minéraux, à chaud et dans certaines conditions, un polyose se décompose en ses oses constituants. Nous avons donc soumis notre liquide d'extraction, soit à l'action de HCl, soit de SO_4H_2. On chauffait à l'autoclave à 110-115° pendant 40 minutes ou au bain-marie à 100° pendant 1 heure 1/2. Les conditions les plus favorables à l'hydro-

lyse complète, sans destruction appréciable de sucre, sont réalisées par une acidité voisine de 0,6 N pour SO_4H_2. Après hydrolyse, on neutralise avec une solution de soude 10 N (soude pure du sodium), on amène à volume convenable avec de l'eau distillée et on filtre. Le mélange de phénylhydrazine et d'acide acétique est ajouté et le liquide clair est introduit dans un gros tube Pyrex. On bouche au coton, on porte au bain-marie bouillant pendant 5 minutes, on filtre le liquide chaud. La liqueur, additionnée d'acétate de soude est placée à nouveau au bain-marie bouillant. Après 35 à 40 minutes, il se forme dans le tube un abondant précipité d'osazones. On filtre bouillant (sur un filtre sans plis lavé à l'eau bouillante) pour recueillir ces osazones insolubles à chaud (*osazones A*), et le filtrat est replacé au bain-marie bouillant pendant 30 minutes environ. Au bout de ce temps on abandonne à la cristallisation dans le bain-marie même. Le précipité d'osazones obtenu après cette deuxième opération (*osazones B*) est nettement plus considérable que le premier.

Osazones A : Examen microscopique. — Ce premier précipité est formé à peu près exclusivement de cristaux de *phénylglucosazones* caractérisées par leur coloration jaune verdâtre typique et leur cristallisation en « branches de genêts ».

Purification. — On les purifie par lavages à l'eau bouillante, puis lavages à froid à l'acétone au demi, au benzène, à l'acétate d'éthyle, on termine par un traitement à l'éther et à l'alcool méthylique. Après séchage, on obtient des osazones d'un jaune vert à l'aspect de paillettes. Elles fondent (fusion instantanée au bloc Maquenne) en même temps qu'une phénylglucosazone préparée à partir de sucre pur et essayée simultanément (230°-232°).

Osazones B : Examen microscopique. — Ce précipité d'osazones, extrêmement abondant par rapport au premier, est constitué presque exclusivement par des cristaux de couleur jaune or qui, examinés au microscope, présentent l'aspect de *galactosazones* petites, mais bien caractéristiques. A peine si, après un examen prolongé, on peut trouver dans le champ du microscope quelques cristaux verdâtres en branches de genêt qui tranchent sur les gros cristaux jaune or des galactosazones.

Purification. — Les galactosazones sont recueillies sur un filtre sans plis. Soigneusement lavées à l'eau froide, on les remet en suspension dans quelques centimètres cubes d'eau distillée froide en s'aidant d'un jet de pissette. Placées alors

au bain-marie bouillant, elles ne se dissolvent pas. On les purifie en les lavant d'abord à l'eau bouillante, puis à froid à l'acétone au demi (une certaine quantité d'osazones se dissout dans ce dernier réactif. Dans le liquide hydroacétonique conservé, nous avons constaté, à la longue, une nouvelle cristallisation de galactosazones extrêmement petites, mais très pures). Les osazones sont encore reprises successivement par le benzène, l'acétate d'éthyle et l'éther. Quand on a obtenu une masse cristalline bien jaune, débarrassée des impuretés, on presse cette masse entre plusieurs doubles de papier filtre pour l'essorer et on termine la dessiccation à l'étuve. Ces osazones se présentent en masse d'aspect soyeux et de nuance marron mordorée. Au bloc Maquenne, on obtient la fusion instantanée à 214°, notre galactosazone standard a son point de fusion à 212°.

L'absence dans les liqueurs, à tous les temps des opérations, de formation d'osazones solubles permet déjà d'éliminer la présence de lactose ou d'holoside de ce type. On sait, d'autre part, que, si l'on soumet à l'action de la phénylhydrazine une solution de lactose (0,5 à 1 p. 100) ayant subi l'hydrolyse complète, on voit surtout, à l'examen microscopique, une masse abondante de cristaux de glucosazones(jaune verdâtre) dans laquelle semblent noyés quelques cristaux de galactosazones. Il est permis d'en déduire que, dans nos liqueurs d'extraction, après hydrolyse totale, la proportion de galactose par rapport au glucose n'est pas celle rencontrée dans le lactose (molécule pour molécule). Des expériences de contrôle, faites avec des mélanges de glucose et de galactose purs à des concentrations différentes, nous ont d'ailleurs montré que le rapport des poids respectifs des deux osazones dans nos mélanges ne peut être approximativement retrouvé que s'il préexiste dans la liqueur 3 molécules de galactose pour 1 molécule de glucose.

Ces expériences permettent les *conclusions suivantes* concernant les liquides d'extraction soumis, avant et après hydrolyse, à l'action de la phénylhydrazine :

A. *Avant hydrolyse.* — On ne décèle aucune osazone soluble, mais seulement une osazone insoluble : la galactosazone.

B. *Après hydrolyse.* — 1. On obtient 2 osazones et 2 osazones seulement : la glucosazone et la galactosazone.

2. La quantité de galactosazone est nettement supérieure à celle de glucosazone.

III. — DOSAGES DES GLUCIDES DANS LE LIQUIDE D'EXTRACTION.

Les analyses ont porté sur des liquides d'extraction différents provenant de quantités de lait variant de 200 à 800 cm^3 de lait. Dans un tableau, sont exposés les résultats comparatifs des dosages se rapportant à ces liquides avant et après traitement par les acides minéraux étendus et chauds.

Détermination du pouvoir rotatoire.

1. Avant hydrolyse. — Chaque liqueur d'extraction (liqueur E) est portée à un volume connu, 50 cm^3 en général, puis examinés au polarimètre dans un tube de 40 cm.

2. Après hydrolyse. — L'hydrolyse a été réalisée en chauffant les liqueurs d'extraction en présence de SO_4H_2 ou HCl, soit au bain-marie à 100° pendant 1 heure 1/2 dans un petit ballon muni d'un réfrigérant à reflux, soit à l'autoclave à 110-115° pendant 45 minutes.

Nous avons, tout d'abord, étudié les diverses proportions d'acide à mettre en réaction afin de déterminer la concentration optima pour une hydrolyse complète sans destruction appréciable de sucre. Ceci est obtenu avec une acidité voisine de 0,6 N pour SO_4H_2. Après divers essais, nous avons eu recours au mode opératoire suivant qui nous permettait de soumettre le contenu de 1 ou 2 des ballons à un dosage préliminaire (pouvoir réducteur).

Mode opératoire : Une quantité, exactement mesurée, de liqueur E est répartie par fractions de 5 cm^3, dans de petits ballons en verre Pyrex de 25 cm^3. A chacun on ajoute la même quantité d'acide dilué nécessaire pour obtenir la normalité de 0,6 N. On bouche au coton de verre, on porte à l'autoclave. Après refroidissement, le contenu de plusieurs ballons (2 par exemple) est transvasé dans un ballon jaugé. On neutralise exactement avec une solution de soude concentrée (10 N) et on porte, avec les eaux de lavage, à volume déterminé (30 cm^3 par exemple). On filtre.

Ce liquide d'extraction, ainsi neutralisé, sert pour le dosage polarimétrique et la préparation des osazones.

A la suite du chauffage, le liquide était faiblement coloré en jaune et l'examen a dû être fait, après hydrolyse, en tube de 20 cm. seulement, car nous voulions éviter l'emploi de décolorant. La solution ayant servi à l'examen polarimétrique est

additionnée d'une quantité de phénylhydrazine et d'acide acétique au 1/2, déterminée d'après le pouvoir réducteur, puis chauffée au bain-marie bouillant avec les précautions indiquées précédemment pour la préparation des osazones.

Détermination du pouvoir réducteur.

Les dosages étaient effectués, sur chaque liqueur d'extraction, comparativement par la méthode iodométrique, le macrobertrand, le microbertrand, la technique de Hagedorn-Jensen, avant et après hydrolyse.

1. Avant hydrolyse. — De la liqueur d'extraction (liqueur E) on prélève 5 cm³ que l'on amène avec de l'eau distillée à 25 cm³ dans un ballon jaugé. Cette liqueur diluée est celle qui sera utilisée pour tous les dosages avant hydrolyse.

2. Après hydrolyse. — Une autre partie, exactement mesurée (5 cm³ par exemple) de la même liqueur E est soumise à l'hydrolyse dans les conditions indiquées. L'hydrolysat, refroidi, est exactement neutralisé avec quelques centimètres cubes de solution de soude 2 N (soude pure du sodium à cause des dosages iodométriques) et le volume est amené à 25 cm³.

Pour mieux saisir l'effet de l'hydrolyse sur les glucides et rendre plus comparatifs les divers dosages, les dilutions ont été faites de telle façon que ces dosages portent, avant comme après action des acides, sur un même volume de la solution primitive.

a. — *Méthode iodométrique.*

On opère, sur une prise d'essai appropriée, selon la technique que nous avons décrite précédemment.

b. — *Méthode de* Bertrand.

Nous avons toujours utilisé au moins une fois pour l'évaluation des glucides dans chaque liquide d'extraction, la méthode de G. Bertrand comme méthode de référence, mais cette technique exige l'utilisation de quantités relativement importantes de sucre. Etant donné le volume restreint de nos liqueurs d'extraction et le nombre important de dosages à exécuter sur chacun d'eux, nous avons eu recours parallèlement à 2 microméthodes : microbertrand et méthode de Hagedorn et Jensen.

c. — *Microméthodes : 1° Microbertrand.*

Cette méthode, perfectionnée par H. Bierry, appliquée au dosage de petites quantités de sucre, donne de très bons résultats à condition d'observer scrupuleusement les précautions indiquées. La réduction, la séparation de l'oxydule par centrifugation, son lavage par l'eau bouillie sont réalisés dans un même tube de centrifugeuse. On utilise pour le dosage 5 cm³ de liqueur sucrée et 2 cm³ de liqueur cuproalcaline. Des tables ont été dressées indiquant la correspondance entre la quantité de permanganate de potassium utilisée pour le dosage et la teneur en sucre de la prise d'essai. Cette méthode se prête aux dosages en série ce qui est un grand avantage. Nous empruntons à H. Bierry [12] la description de cette technique.

Dans un tube conique (Pyrex) de centrifugeuse de 10 cm³ de capacité, on introduit 5 cm³ de la solution sucrée (ou le volume adéquat de solution sucrée complétée à 5 cm³ avec de l'eau distillée), puis 2 cm³, exactement mesurés, de liqueur cuproalcaline préparée extemporanément en mélangeant, avec un agitateur, des volumes égaux de liqueur bleue et blanche (formule G. Bertrand). Les tubes de centrifugeuse, bouchés légèrement au liège, sont répartis dans les compartiments d'un support métallique et plongés dans l'eau maintenue bouillante d'un bain-marie (de façon que la partie du tube remplie de liquide soit immergée) pendant 6 minutes exactement.

Après refroidissement, obtenu en plongeant brusquement tube et support dans l'eau froide, on centrifuge 2 à 3 minutes à une vitesse de 2000 tours environ. On filtre sur amiante en utilisant un appareil semblable à celui de G. Bertrand, mais de dimensions réduites.

Le précipité d'oxydule est lavé à l'eau bouillie et chaude, puis dissous dans 3 à 5 cm³ (selon besoin) de solution de sulfate ferrique (formule G. Bertrand). On lave le tube de centrifugeuse dans lequel la réduction a été opérée et le filtre d'amiante avec 20 cm³ environ d'eau distillée versée en trois reprises. On dose ensuite avec une solution exactement mesurée de permanganate de potassium versée avec une burette graduée en 1/20e de centimètre cube.

Pour le calcul, il est commode de préparer une solution de permanganate dont 1 cm³ équivaut à 1 mg. de cuivre. Cette solution est stable si on a eu soin d'utiliser pour sa préparation de l'eau bidistillée dans un appareil en Pyrex.

D'après la quantité de MnO_4K, utilisée pour transformer le sel ferreux en sel ferrique, on calcule la quantité de cuivre correspondante et l'on en déduit l'équivalent en glucose anhydre en utilisant une table dressée à cet effet. Nous avons employé cette technique, mais en faisant usage de la table ci-jointe établie en partant du galactose anhydre et pur.

Cu en mg.	Galactose en mg.	Cu en mg.	Galactose en mg.	Cu en mg.	Galactose en mg.
0,28	0,00	2,65	1,30	4,30	2,25
1,35	0,60	2,80	1,40	4,75	2,50
1,50	0,70	3,00	1,50	5,10	2,75
1,70	0,80	3,15	1,60	5,60	3,00
1,90	0,90	3,35	1,70	5,95	3,25
2,10	1,00	3,50	1,80	6,30	3,50
2,25	1,10	3,75	1,90	6,65	3,75
2,45	1,20	3,90	2,00	7,10	4,00
		4,05	2,10		

En observant certaines précautions, si l'on met en réaction des quantités de galactose égales ou inférieures à 1 mg. on obtient des résultats très satisfaisants. Dans chaque méthode du reste, quelle que soit cette méthode, il y a des zones de moins grandes précisions.

2° Microméthode de Hagedorn *et* Jensen.

Principe. — On sait que le ferricyanure en solution, sous l'influence des réducteurs, se transforme en ferrocyanure en cédant de l'oxygène. La solution sucrée est chauffée avec un excès de solution titrée de ferricyanure en milieu alcalin : une fois l'oxydation du sucre réalisée, le milieu contient du ferrocyanure en quantité proportionnelle à celle du glucide et un excès de ferricyanure. Le ferricyanure restant, traité par un iodure en milieu acide (HI) est réduit en ferrocyanure avec libération d'iode que l'on titre par l'hyposulfite.

La réduction du ferricyanure par HI est une réaction réversible :

$$2\ Fe\ (Cy)_6H_3 + 2\ HI \rightleftarrows 2\ Fe\ (Cy)_6H_4 + I_2$$

pour la rendre totale on élimine le ferrocyanure formé en le précipitant à l'état de combinaison zincique.

Mode opératoire. — a. Réduction : dans un gros tube de centrifugeuse en verre blanc introduire une quantité de liqueur désalbuminée (quantité inférieure à 12 cm³) renfermant une quantité de sucre comprise entre 0,125 et 0,250 mg. Compléter à 12 cm³ avec de l'eau distillée. Ajouter 2 cm³, très exactement mesurés à la pipette de précision, de la solution suivante : ferricyanure de potassium *pur* (0,005 N) 1,65 g., carbonate de soude anhydre et pur (0,01 N) 10,6 g., eau q.s.p. 1000 cm³. Rincer les parois d'un jet de micropissette. Boucher les tubes avec du papier filtre, les placer dans un support métallique au bain-marie bouillant pendant 15 minutes très exactement.

b. Dosage du ferricyanure restant : après refroidissement, on ajoute, dans chacun des tubes, 3 cm³ de solution iodozincique (cette solution ne se conservant pas on prépare en stock la solution suivante : SO_4Zn 10 g., NaCl 50 g., eau q.s.p. 2000 cm³ et, au moment de l'emploi, on ajoute 1,25 g. environ de IK à 50 cm³ de cette solution). Quelques minutes avant titrage, acidifier chaque tube par 2 cm³ d'acide acétique à 3 p. 100 et titrer l'iode libéré par $S_2O_3Na_2$ 0,005 N, soigneusement étalonné vis-à-vis d'une solution titrée d'iodate. Il faut opérer avec une microburette graduée au 1/100e de cm³. Terminer le dosage en présence de réactif de Tromsdorff-Boettger en observant le virage en regardant non par transparence, mais dans l'axe des tubes placés sur fond blanc.

Il est nécessaire d'effectuer un dosage témoin sans liqueur sucrée.

Hagedorn et Jensen [**61**] ont établi une table permettant de passer directement du nombre de cm³ d'hyposulfite 0,005 N utilisé pour le dosage à la quantité de glucose renfermée dans la solution. D'autres auteurs adaptèrent cette méthode au microdosage du maltose (Hanes), du sucre interverti (Callow), du fructose et des mélanges de sucre (Hulne et Narain), et du galactose (Gale [**52**]). Ce dernier a même établi, pour le galactose, une table particulière que nous avons utilisée pour nos dosages. Après des essais sur des solutions de galactose pur, nous avons constaté que la méthode de Hagedorn et Jensen gardait toute sa précision quand les dosages portaient sur des quantités de galactose comprises entre 0,125 mg. et 0,250 mg.

IV. — EXPOSÉ ET DISCUSSION DES RÉSULTATS.

Les liquides d'extraction, soumis à l'analyse, provenaient d'un mélange de laits de Femme, et chaque mélange était constitué par des échantillons d'origine différente. Ces laits étaient déprotéinés par l'acide silicotungstique, puis traités par le sulfate mercurique comme il a été exposé au début de ce chapitre. Les solutions obtenues après les diverses opérations, concentrées dans le vide à basse température, sont amenées à volume connu : à 50 cm³ ou à 100 cm³, suivant la quantité de lait au départ. Des essais préliminaires ont montré qu'une extraction portant sur 200 cm³ de lait seulement était insuffisante pour assurer les divers dosages qui se trouvaient, de ce fait, réduits à des examens polarimétriques et à des microdosages. Nous avons donc mis en œuvre des quantités plus importantes de 400 à 800 cm³. Il devenait alors possible de réaliser, sur les liquides, avant et après hydrolyse, les recherches avec la phénylhydrazine, et toutes les opérations quanti-

tatives : macrobertrand, microbertrand, méthode iodométrique, technique de Hagedorn et Jensen, examen polarimétrique, dans de bonnes conditions.

On sait que les liqueurs cuproalcalines qui servent à définir les sucres réducteurs s'attaquent indifféremment aux sucres aldéhydiques et aux sucres cétoniques ; au contraire l'iode, en milieu alcalin, s'attaque exclusivement aux sucres aldéhydiques. Il est donc logique de tirer, de la comparaison des résultats obtenus avec ces deux méthodes, des déductions sur la composition des sucres contenus dans la solution.

Avant hydrolyse. — Les dosages, effectués sur les liquides primitifs d'extraction, non encore soumis à l'action des acides dilués et chauds, par les méthodes de Hagedorn-Jensen et de Bertrand (macro ou micro) fournissent des chiffres voisins, chiffres nettement supérieurs à ceux donnés par la méthode iodométrique. Ces derniers, par contre, se rapprochent beaucoup de ceux obtenus par l'examen polarimétrique (effectué en tube de 40 cm.). Le simple fait de l'ébullition en présence d'une liqueur faiblement alcaline (Hagedorn-Jensen), ou fortement alcaline (Bertrand), provoque donc l'apparition, dans le mélange, d'un autre glucide, de libération relativement facile. Comme dans ces liqueurs, utilisées telles quelles ou préalablement traitées par des alcalis dans les conditions requises lors de la titration, un seul sucre réducteur : le galactose peut être mis en évidence par son osazone, il est permis de conclure que le glucide labile, ainsi libéré par ébullition et qui vient se surajouter au galactose déjà existant est également du galactose. Il est donc logique d'évaluer, dans ce cas, le pouvoir réducteur en galactose anhydre, puisque ce sucre est le seul glucide présent.

Après hydrolyse. — L'épreuve des osazones montre que le glucose apparaît après hydrolyse seulement, et que, dans les hydrolysats, le poids des glucosazones est nettement inférieur à celui des galactosazones. Ceci prouve, pour des raisons déjà exposées, que, dans ces liqueurs, 1 molécule de glucose se trouve en présence de plusieurs molécules de galactose. Si la méthode iodométrique ne décèle aucune différence dans l'expression des résultats en ce qui concerne le glucose ou le galactose, il n'en est pas de même des méthodes de Bertrand (micro ou macro) et de Hagedorn-Jensen, par suite de l'emploi de tables spéciales dressées pour ces deux aldoses. Or, en admet-

tant une proportion de 3 molécules de galactose pour 1 molécule de glucose, les chiffres obtenus se montrent concordants pour toutes les méthodes. On est donc autorisé à considérer, dans les hydrolysats, la présence d'un mélange ainsi constitué. Les dosages polarimétriques, quoique moins précis quand ils portent sur les hydrolysats à cause de la dilution nécessaire, fournissent également un argument en faveur de cette conception et permettent d'éliminer définitivement la présence de *d*-fructose. Enfin on déduit que le pouvoir cuproréducteur final est dû exclusivement à des sucres aldéhydiques.

Tous ces faits ressortent d'un grand nombre de résultats obtenus à partir de liquides d'extraction provenant de quantités de lait variant de 200 à 800 cm³. De ces expériences, relatives à l'« indosé glucidique » nous rapportons, sous forme de tableau, 2 exemples dans lesquels des volumes importants de lait ont été mis en œuvre. Les chiffres donnés sont suffisamment suggestifs.

La première opération portait sur 800 cm³ de lait de Femme, la seconde sur 450 cm³, le volume final de la première liqueur d'extraction (I) étant ramené à 100 cm³ et celui de la seconde (II) à 50 cm³ seulement.

Le pouvoir réducteur des glucides est exprimé en galactose anhydre dans les liqueurs avant hydrolyse, et en glucose-galactose (calculé dans la proportion de 3 molécules de galactose et 1 molécule de glucose) dans les hydrolysats. Cette quantité de glucides, indiquée en g., est rapportée à 100 cm³ pour le liquide d'extraction I, à 50 cm³ pour le liquide d'extraction II, représente le poids des glucides globaux, constituant l'« indosé glucidique », extraits ainsi de 800 et de 450 cm³ de lait de Femme.

	Liqueur d'extraction I		Liqueur d'extraction II	
	avant hydrolyse	après hydrolyse	avant hydrolyse	après hydrolyse
	en g. galactose	en g. galactose-glucose	en g. galactose	en g. galactose-glucose
Microbertrand	0,88 0,90	1,26	0,52	0,80
Macrobertrand	0,88	1,28	0,51	0,79
Hagedorn-Jensen ...	0,92	1,30	0,49	0,77
Méth. iodométrique..	0,70	1,26	0,43	0,79
Polarimètre	0,68	1,14	0,43	0,71

CONSTITUTION DE L'HYDRATE DE CARBONE COMPLEXE ÉLIMINÉ PAR LES SELS DE MERCURE.

Les sels mercuriques ajoutés au lait, préalablement désalbuminé, éliminent : un complexe renfermant des glucides, des sels (parmi lesquels les phosphates ont été caractérisés), et une substance d'une nature particulière dont il sera question plus loin.

Dans le lait de Femme, les glucides éliminés par les sels de mercure se trouvent en quantité relativement appréciable. Ces glucides, mélange en quantités inégales de glucose et de galactose, libérables par hydrolyse, sont les parties constituantes d'un oside dont la présence dans le lait n'a pas encore été signalée.

La première hypothèse qui se présente à l'esprit est que ces hexoses pourraient provenir de l'hydrolyse plus ou moins poussée d'un « oligosaccharide » préexistant dans le lait. Dans ce cas, ce pourrait être un polyholoside dont une partie de la molécule, excessivement labile, donnerait, dans une première hydrolyse, du galactose et un holoside, relativement plus stable, susceptible de fournir à son tour du glucose et du galactose. Envisageons seulement parmi les oligosaccharides connus ceux qui se rapportent à notre cas :

Un pentaholoside : le *verbascose* dont le pouvoir rotatoire est élevé, renferme trois molécules de galactose, une molécule de glucose et une molécule de fructose.

Le *stachyose* $C_{24}H_{42}O_{11}$ ou galactosido-galactosido-glucosido-fructoside, admis à l'origine (par Planta et Schulze) comme triholoside, est en réalité un tétraholoside : le *mannéotétrose* de Tanret. Il donne à l'hydrolyse du *d*-fructose (une molécule), du *d*-glucose (une molécule) et du *d*-galactose (2 molécules).

Dans le groupe des triholosides en C_{18}, nous trouvons : le 6 [β-*lactosido*]-d-*galactose synthétique* de Freudenberg [**51**], qui est dextrogyre $[\alpha]_D^{18°} = + 22°2$ et donne une osazone (P.F. = 211°).

Le *manninotriose* [**147**] provenant du stachyose, qui s'hydrolyse en 1 molécule de glucose et 2 molécules de galactose. Il a un fort pouvoir rotatoire droit (+ 167°) et fournit une osazone soluble dans l'eau chaude.

Ces caractères analytiques font rejeter l'hypothèse de la

présence de ces polyoses qui ne sont d'ailleurs pas entraînés, ni hydrolysés par les sels de mercure.

Le corps générateur du galactose libéré au cours de l'extraction est-il un galactobiose ?

Rappelons que, d'une manière générale, ces corps sont stables, actifs sur la lumière polarisée, et donnent des osazones. Tel est le cas par exemple du *galactosido-galactose* de Fischer et Armstrong, du 6[β-*d*-galactosido]*d*-galactose (Freudenberg), des deux galactobioses de Bourquelot et Aubry : *galactobiose A* ($[\alpha]_D^{17°} = + 30°3$), et *galactobiose B* ($[\alpha]_D^{17°} = + 47°6$). Les osazones de ces deux derniers fondent respectivement à + 194° (A) et + 125° (B).

Signalons enfin qu'un galactobiose de structure particulière (type *tréhalose*) (*) a été obtenu par synthèse par Vogel et Deboroska-Kurnicka [151] ; il possède un pouvoir rotatoire élevé.

A la suite des analyses effectuées sur nos solutions qui ont montré l'absence de dérivés caractéristiques de ces corps, la présence des divers glucides précités ne peut donc être envisagée. Examinons les faits de plus près.

1° Le lait. — Considérons d'abord le lait lui-même. Déprotéinons une partie d'un même lait par l'acide silicotungstique et une autre partie par les sels de Hg, de façon à réaliser un filtrat silicotungstique et un filtrat mercurique. Si l'on effectue sur le premier filtrat le dosage des glucides, comparativement par la méthode de Bertrand et par la méthode iodométrique, on trouve une quantité de sucre plus forte par la première que par la seconde ; si on titre les glucides dans le filtrat mercurique, le chiffre obtenu par la méthode de Bertrand est inférieur à celui trouvé par cette méthode précédemment dans le filtrat silicotungstique. Par contre, la teneur en glucides des filtrats silicotungstique et mercurique, évaluée par la méthode iodométrique, se révèle la même aux erreurs expérimentales près.

Nous savons que le complexe existe dans le filtrat silicotungstique sous sa forme originelle, alors qu'il est absent dans les filtrats mercuriques. Nous sommes donc en droit de conclure :

(*) Tréhalose et isomères : disaccharides non réducteurs dont les configurations respectives sont les suivantes :

α α glucosido-glucoside = tréhalose.
β β glucosido-glucoside = isotréhalose de Fischer et Delbrüch.
α β glucosido-glucoside = isotréhalose de Schlubach.

1° qu'à l'état natif, le complexe n'est pas optiquement actif, n'a pas d'action sur l'iode, et que, par suite, le galactose ne s'y trouve pas à l'état libre ; 2° que, par simple ébullition, en milieu alcalin, il y a libération d'un sucre réducteur : le galactose, comme il a été démontré, dont la fonction aldéhydique était primitivement bloquée dans le complexe puisqu'il ne titrait pas à l'iode.

2° Liquide d'extraction. — Faisons maintenant un dosage iodométrique sur le liquide d'extraction, tel que nous l'obtenons (après traitement par les sels de Hg, démercurisation, neutralisation, concentration à 60°), nous constatons, cette fois, la présence d'un sucre aldéhydique titrant à l'iode. C'est donc qu'au cours des manipulations nécessitées par l'extraction il y a eu libération d'un aldose (galactose) primitivement dissimulé dans le complexe.

Il est logique de penser que dans le « liquide d'extraction », la quantité de sucre obtenue par la méthode de Bertrand représente : 1° d'une part, la « valeur réductrice » du sucre aldéhydique libéré au cours de l'extraction (dosable à l'iode et au polarimètre et qui appartient, comme nous le verrons, à un ester phosphorique du galactose) ; 2° d'autre part, un « excédent » provenant d'un composé glucidique peu stable, le simple fait de l'ébullition en milieu alcalin suffisant à en libérer une partie. De plus on peut admettre que cet « excédent » est représenté par une même quantité de sucre libérable : soit à partir du complexe originel, soit dans notre liquide d'extraction dans des conditions (concentration, proportion de liqueur cuproalcaline, etc.) rigoureusement identiques.

Cette libération de galactose, à l'ébullition, a lieu non seulement à partir du filtrat silicotungstique, mais aussi à partir du liquide d'extraction dans lequel l'ester galactose-phosphorique a été entièrement décomposé en ses éléments constituants. Par suite, cette libération de galactose nouveau ne peut plus être attribuée à l'ouverture d'une chaîne par début d'hydrolyse d'un autre ester galactose-phosphorique, mais à la désagrégation d'un corps, générateur de galactose, qui est alcalino-labile. Ce corps, assez alcalino-labile pour céder du galactose en présence de liqueur cuproalcaline à l'ébullition, est relativement acido-stable puisqu'il se retrouve dans la liqueur d'extraction après les manipulations qui ont déterminé le dédoublement de l'ester ose-phosphorique.

Cette « substance galactogène » qui persiste dans le reste de complexe, dont le galactose-phosphate a été éliminé par un premier clivage, ne réagit pas avec l'iode. Il est permis de penser qu'elle est constituée par un polysaccharide ne présentant pas de fonction aldéhydique libre.

En résumé, le complexe originel renferme entre autres constituants : un ester galactose-phosphorique acido-labile et un polysaccharide alcalino-labile. Ce complexe n'est pas optiquement actif ou possède un très faible pouvoir rotatoire, il ne titre pas avec l'iode. Les fonctions aldéhydiques des oses qu'il renferme sont donc dissimulées. Une mise en liberté de galactose peut être provoquée soit aux dépens du corps acido-labile, soit du corps alcalino-labile, suivant le mode opératoire primitivement mis en jeu. Après élimination du corps acido-labile (ose-phosphate) subsiste encore un polysaccharide ne réagissant pas avec l'iode.

Voici l'hypothèse qui cadre le mieux avec les faits :

1° La présence dans le liquide d'extraction : de galactose d'une part, et, d'autre part, l'apparition de P minéral au cours des manipulations nécessaires à cette extraction, font penser qu'il y a primitivement, dans le complexe originel, un ester galactosephosphorique dont la présence est dissimulée ; ester *acido-labile* qui a subi l'hydrolyse pendant les diverses opérations.

2° La mise en liberté d'un glucide réducteur par simple ébullition, en milieu alcalin, du liquide d'extraction, indique une nouvelle hydrolyse, celle d'un corps *alcalino-labile* cette fois, préexistant également dans le complexe. Ceci serait facilement expliqué par la présence d'une hexosane, vraisemblablement d'une polyhexosane, qui, instable en ces conditions, se dissocierait plus ou moins régulièrement selon sa concentration dans le milieu. Une première hydrolyse partielle, par fixation d'une seule molécule d'eau sur la molécule d'un de ces anhydrides composants, suffirait pour régénérer l'ose correspondant, ici le galactose.

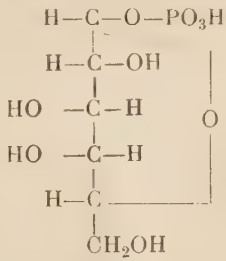
3° Enfin une partie beaucoup plus stable du complexe subsiste après ces divers temps, de sorte qu'une hydrolyse acide est nécessaire pour libérer entièrement tous les oses individuels constituant cet ensemble.

De sorte que l'on peut envisager dans le complexe trois parties : une partie acido-labile, une partie alcalino-labile, une partie relativement acido-stable.

I. — Partie acido-labile du complexe : présence d'un ester phosphorique du galactose.

Parmi les esters phosphoriques d'oses ou d'holosides actuellement connus, deux peuvent être envisagés dans le cas présent : le *phospho-1-galactose* (Kosterlitz [88]) et le *phospho-6-galactose* (Levene et Raymond [93]). Le radical glucidique (galactose) est combiné à la fonction acide la plus faible de l'acide phosphorique. Les esters phosphoriques ont deux fonctions acides libres qui sont plus dissociées que celles de l'acide orthophosphorique ; il en résulte ce fait, en apparence paradoxal, que les esters de l'acide phosphorique sont plus acides que ce dernier.

Kosterlitz a préparé l'acide galactose-1-phosphorique (ou phospho-1-galactose). Ce composé, dextrogyre comme les α glucosides, est vraisemblablement le *monophospho-1-α-galactopyranose* dont la formule est la suivante :



Le même auteur en a démontré la présence dans le foie de Lapins recevant du galactose dans leur nourriture.

Ce corps peut être rangé dans les α galactosides. On sait que les α galactosides ont un pouvoir rotatoire droit, supérieur à celui du galactose, tandis que les β galactosides sont en général lévogyres ou possèdent un faible pouvoir rotatoire droit.

x.	α Méthylgalactopyranoside .	= +196°6	(Ruber, 1929).
	α Ethylgalactoside	= +186°8	(Pascu et Ticharich, 1929).
	α Propylgalactoside	= +179°0	(Bourquelot et Aubry, 1916).
	α Allylgalactoside	= +171°7	(Pascu et Ticharich, 1929).
	α Acide galactose-1-phosphorique.....	= +148°5	(Kosterlitz, 1939).
	β Méthylgalactoside	= ± 0	(Bourquelot et Bridel, 1913).
	β Ethylgalactoside	= — 4°	(Bourquelot et Hérissey, 1912).
	β Allylgalactoside	= — 12°15	(Bourquelot et Bridel, 1913).
	β Benzylgalactoside.....	— 25°05	(Bourquelot, Hérissey et Bridel, 1913).
	β Phénylgalactoside	= — 39°83	

Un autre ester du galactose : le *phospho-6-galactose* a été obtenu, par synthèse, à partir de l'acétone-galactose.

Les esters en C_1 sont les plus acido-labiles. Ainsi, pour l'acide galactose-1-phosphorique, l'hydrolyse, déjà manifeste à 25° en présence des acides 0,25 N, devient totale à 100 ° en deux minutes sous l'action de SO_4H_2 0,09 N. Mais les esters en C_6 (phospho-6-galactose) sont moins facilement hydrolysables.

Kosterlitz a préparé également le *baryum-galactose-1-phosphate* et le *dipotassium-galactose-1-phosphate*. Pour le premier (sel anhydre de baryum) $[\alpha]_D^{18°} = + 92°7$ et le rapport galactose/P = 5,8 ; pour le second $[\alpha]_D^{18°} = + 108°2$. Ces sels sont très solubles dans l'eau, très facilement hydrolysables ; à partir du di-potassium-galactose-1-phosphate, par exemple, additionné de HCl 0,25 N, il y a déjà 10 p. 100 de galactose mis en liberté après 50 minutes à 25°.

Les esters en 1 des aldohexoses ne sont pas réducteurs. Sous l'action des hydrazines à froid il forme des hydrazones qui conservent les caractères de celles des sucres libres. A chaud, suivant la position de la liaison phosphorique, il peut y avoir mise en liberté de l'acide phosphorique et, dans ce cas (esters en 1), l'osazone du sucre libéré précipite et peut être identifiée. Les esters en 6 (glucose, mannose, fructose) donnent la *phospho-6-glucosazone* ; le *galactose-6-phosphate* conduit également à une osazone phosphorée.

Comme l'acide lui-même a un très fort pouvoir rotatoire droit et qu'il n'est pas réducteur, il faut admettre que la déphosphorylation a été complète dans les diverses opérations qui ont lieu lors de l'extraction : addition d'une solution acide de sels de mercure et surtout concentration dans le vide en milieu très légèrement acide à une température voisine de 60°. La preuve en est donnée par le fait que la solution ne renferme plus que des quantités de P très faibles. En effet nous avons vérifié que, dans notre solution, il n'existait que des petites quantités de P minéral. La méthode la plus sensible est celle mesurant l'intensité de la coloration bleue du complexe phosphomolybdique réduit. Cette technique, inaugurée par Osmond, a été mise au point par Bell et Doisy qui utilisent comme réducteur du complexe l'hydroquinone. Briggs [28] ajoute le sulfite de soude à l'hydroquinone pour renforcer l'action réductrice. Un certain nombre de variantes ont été proposées

en vue du dosage du P sous ses diverses formes dans les liquides biologiques (*).

La quantité de P, obtenue ainsi, est très faible pour nos liqueurs. Ainsi dans un volume donné (50 cm^3) de solution, nous trouvons : 1 mg. de P pour 35 mg. de galactose par exemple. Par contre, une proportion relativement importante de P se trouve dans le précipité obtenu, lors de la neutralisation par la baryte du liquide d'extraction démercurisé (voir chapitre extraction).

La quantité de P minéral n'augmente pas si on soumet les liquides à l'action des acides chauds ou à divers traitements, la déphosphorylation est donc totale.

L'inclusion dans le complexe originel d'un ester galactose-phosphorique, très facilement hydrolysable, explique bien l'apparition de galactose dans le liquide d'extraction au cours des phases de l'opération. Seul le phospho-1-α-galactopyranose peut être ici envisagé, car il est très *acido-labile*, alcalino-stable et non réducteur. Il ne peut s'agir du phospho-6-galactose qui est réducteur, acido-stable et donne une osazone phosphorée.

L'acide galactose-phosphorique, préexistant dans le complexe, peut être lié à l'hexosane dont nous parlerons dans le chapitre suivant ou à des substances colloïdales. Salomon, Hold et Peters [134], Dische ont montré que certains esters phosphoriques du sang présentaient avec les colloïdes des hématies une liaison très labile, puisqu'il suffisait pour la détruire d'opérer l'hémolyse du sang à l'aide de la saponine.

(*) Certains phosphates minéraux (les pyrophosphates par exemple) ne donnent pas la réaction de Bell-Doisy. Il en est de même de certaines combinaisons organiques du P. P devient dosable dans ces composés après attaque nitroperchlorique à chaud par la méthode de Bell et Doisy, laquelle permet la détermination des ions $PO_4^{\equiv}$.

II. — Partie alcalino-labile du complexe : présence d'une « substance galactogène » appartenant vraisemblablement au groupe des hexosanes.

Rappelons tout d'abord quelques expériences antérieures de Ritthausen [130].

Nous avons vu que cet auteur, dans un mémoire datant de 1877 très rarement cité mais jamais analysé, signale dans le lait, à côté du lactose, la présence en petites quantités d'un autre hydrate de carbone. Voici son mode opératoire : le lait, dilué de 20 fois son volume d'eau, est traité par l'acétate ou le sulfate de cuivre. Il se forme, écrit-il, un précipité qui renferme, en dehors des albumines, liées au cuivre, la totalité des graisses contenues dans le lait. Ce précipité est lavé à l'eau, traité à l'alcool absolu et enfin à l'éther. La solution alcoolique qui a servi au traitement des graisses reste trouble, il semble bien qu'elle renferme une quantité appréciable d'autres corps. Les solutions éthéro-alcooliques sont évaporées et il reste, par dessiccation, une masse incomplètement soluble dans l'éther. Par agitation avec ce solvant, on sépare le plus souvent une substance qui se présente en gouttelettes transparentes, brunâtres ou en flocons se déposant au fond du vase. On la libère des graisses par lavage à l'éther. La substance ainsi obtenue, qui est en très faible quantité, se dissout facilement dans l'eau. « La solution aqueuse donne avec un peu de liqueur cupropotassique la coloration bleue classique et, par chauffage, une petite quantité d'oxydule ; additionnée de quelques gouttes de SO_4H_2 dilué, elle donne, après léger chauffage, une réduction importante ». L'alcool précipite de la solution aqueuse les flocons, mais une partie de la substance paraît rester en solution. Par concentration à chaud il reste un dépôt à allure de cuir ou de caoutchouc ; par dessiccation au-dessus de SO_4H_2 ou à l'air on n'obtient jamais de cristaux, mais un produit d'aspect corné. « Les réactions montrent que cette substance n'est pas identique au sucre de lait et ne peut lui être identifiée, comme je l'ai reconnu dès le début », note Ritthausen, et il ajoute « La rareté du corps obtenu n'a pas permis des recherches étendues pour déterminer la nature et les propriétés d'une substance qu'il faut certainement ranger parmi les dextrines plutôt qu'avec le sucre de lait ».

A leur tour, Schmöger [135], Landwehr [90] étudient ce

composé. Landwehr pense que le corps obtenu par Ritthausen peut être identifié à un hydrate de carbone qu'il a découvert et nommé « gomme animale ». Il trouve cet hydrate de carbone aussi bien dans le liquide d'ascite chyleux que dans le lait. Dans ces émulsions, la « *gomme animale* » serait à l'état libre. Il préconise pour l'obtention de ce composé de le combiner avec l'oxyde de cuivre, comme fait Ritthausen.

D'après Landwehr, la « gomme animale », dont l'analyse élémentaire révèle une teneur :

C	44,12 p. 100
H	6,24 -

aurait la formule $C_6H_{10}O_5$.

Au début de ce chapitre, nous avons noté que, lors de l'obtention du complexe, ce dernier était accompagné d'un autre corps. Or, ce corps, précipitant par simple refroidissement à 0°, présente bien les caractères de la substance décrite par Ritthausen : aspect de caoutchouc durci après traitement à l'eau bouillante. Il est très possible que la substance isolée par Ritthausen et nommée « dextrine » soit en réalité un mélange de la substance cornée et de la dextrine elle-même, ces deux substances coexistant dans le lait. Nos investigations portant sur les glucides en solution, nous avons, au contraire, cherché à éliminer la « substance cornée » de notre liquide d'extraction. Etant donné d'ailleurs la quantité infime de cette substance nous n'en avons pas poursuivi l'étude, nous réservant d'y revenir.

En admettant la réalité de la « dextrine » isolée par Ritthausen, qui employait une méthode différente de la nôtre, il faut penser que, dans nos expériences, ce corps est entré en solution. Il s'apparenterait plutôt aux polyhexosanes qu'aux dextrines (*).

(*) On aurait pu se demander également si on ne se trouvait pas en présence d'une substance voisine du *galactogène*, car May [**100**] précisément sépare le galactogène du glycogène par combinaison cuprique du premier.

Le galactogène est un polysaccharide donnant quantitativement du galactose (β galactose) par hydrolyse acide. Son pouvoir rotatoire est lévogyre $[\alpha]_D = -22°73$. Il ne donne pas la réaction à l'iode du glycogène, n'est ni attaqué par la diastase salivaire, ni altéré par chauffage avec la potasse à 40 p. 100. Il a pour formule $(C_6H_{10}O_5)n$. May l'a découvert dans les œufs d'Escargot (dans les œufs d'*Helix Pomatia*, le glycogène est totalement remplacé par le galactogène). Chez l'Escargot même, il ne se rencontre que dans les glandes à albumines (Eiweissdrüse). May a retrouvé ce corps également dans les œufs de Limace, chez l'Anodonte, la Carpe, le Lapin, et dans le placenta humain.

D'après nos recherches, la présence du galactogène dont la molécule est très stable ne peut être envisagée ici.

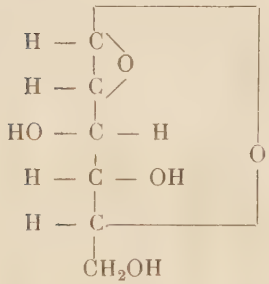
Avant d'invoquer les raisons qui nous ont conduits à envisager la présence d'hexosanes, il est nécessaire de résumer quelques travaux de Pictet et de ses collaborateurs sur la constitution et les propriétés de ces composés particuliers.

A. — Glucosane — Lévuloglucosane.

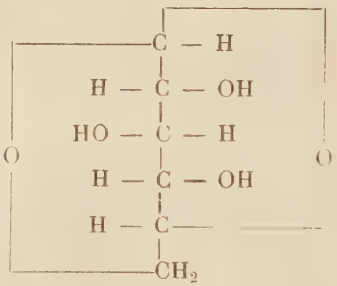
Deux anhydrides du glucose, l'un dextrogyre (glucosane), l'autre lévogyre (lévoglucosane) ont été découverts l'un par Gelis (1838), l'autre par Tanret (1894). Le premier s'obtient en chauffant le glucose α. Le second a été reproduit depuis, par distillation dans le vide, non seulement de l'amidon, de la cellulose, de divers osides dans lesquels le glucose est engagé sous la forme β (A. Pictet et Sarasin), mais encore du glucose β lui-même (Karrer).

En outre du pont oxydique en 1-5, l'anhydride du glucose α possède un cycle en 1-2, et celui du glucose β un cycle en 1-6. L'anhydrisation se fait entre un groupe aldéhydique et un groupe alcoolique (formation d'acétal) et non entre 2 oxhydryles alcooliques (formation d'ester-oxyde).

Les formules de ces deux anhydrides sont donc les suivantes :



(glucosane ou anhydride du glucose α)
anhydro<1,5><1,2>glucose



(lévoglucosane ou anhydride du glucose β)
anhydro<1,5><1,6>glucose

Amé Pictet et ses collaborateurs qui ont étudié ces corps ont préparé aussi les anhydrides du lévulose, du maltose, du galactose et du lactose. Ces anhydrides se rapprochent de la glucosane (glucosane α) par leurs propriétés. Ce sont des corps solides, amorphes ou vaguement cristallins, extrêmement solubles dans l'eau. Ils réduisent la liqueur cupropotassique, ne fermentent pas avec la levure de bière ; chauffés avec l'acé-

tate de phénylhydrazine ils donnent les osazones des sucres dont ils dérivent. Ils régénèrent ces mêmes sucres par simple ébullition avec l'eau.

Seule la lévoglucosane (glucosane β) se comporte autrement ; elle est bien cristallisée et se montre beaucoup plus stable. Elle ne réduit pas la liqueur de Fehling, ne donne pas d'osazones et n'est pas tranformée en glucose par l'eau chaude, mais seulement par les acides minéraux.

Les anhydrides des sucres, sauf la maltosane, possèdent en commun un caractère fort intéressant : c'est la tendance à la polymérisation. Ainsi la glucosane peut donner des polyglucosanes (di à hepta). La galactosane, la lactosane, se comportent de même (A. Pictet, J. Pictet et Ross). La lévoglucosane, par chauffage, est transformée en tétralévoglucosane : $(C_6H_{10}O_5)n$. Du reste la déshydratation, même dans le vide, s'accompagne d'une polymérisation partielle.

La pression, elle aussi, a une influence sur le degré de polymérisation. Ainsi, sous la pression de 15 mm. de mercure, à 155°, la glucosane donne exclusivement une diglucosane $(C_6H_{10}O_5)_2$, la lévoglucosane, dans les mêmes conditions, une dilévoglucosane. Cette polymérisation est facilitée par divers catalyseurs (noir de Pt, $ZnCl_2$, etc.). En effectuant la polymérisation de la lévoglucosane on obtient, en présence de $ZnCl_2$, des hexa et des octo lévoglucosanes (A. Pictet) et, en utilisant la poudre de zinc, des tri, penta, hepta lévoglucosanes (Irvine et Oldham [75]). A partir également de la lévoglucosane ont été isolés une série de dextrines et un hydrate de carbone à poids moléculaire élevé analogue à la cellulose. On a même pu préparer des dextrines analogues, dans une certaine mesure, aux polyamyloses retirées de l'amidon, étudiées par Schardinger, Pringsheim, Karrer. Tous ces polymères sont des corps amorphes, solubles dans l'eau, moins solubles dans l'alcool. S'ils ont l'apparence des dextrines, ils en diffèrent par un poids moléculaire plus faible et aussi par leur constitution. Aucun n'est coloré par l'iode, ne précipite par les réactifs spéciaux des dextrines, ne donne de solution colloïdale.

B. — Dihexosanes et disaccharides.

D'après la composition de la diglucosane et de la dilévoglucosane, exprimée par la formule $C_{12}H_{20}O_{10}$, on peut voir en ces deux corps les premiers anhydrides de deux disaccharides

$C_{12}H_{22}O_{11}$. Du reste, il a été possible de les transformer en ces derniers par une hydrolyse partielle, en fixant sur leur molécule une seule molécule d'eau. L'hydrolyse partielle de la diglucosane fournit un nouveau disaccharide : l'*α-glucosyl-2-glucose*, qui réduit la liqueur cupropotassique, mais ne donne pas d'osazone. L'hydrolyse ménagée de la dilévoglucosane aboutit à la formation du *β-glucosyl-3-glucose* qui n'est autre que l'*isomaltose* (Pictet et Georg).

Ce procédé ne s'applique qu'aux seuls disaccharides, formés de 2 restes d'hexoses identiques et liés symétriquement ; or, cette disposition n'est pas celle de divers saccharides naturels, du lactose en particulier. Pour aboutir au lactose, il faudrait prendre comme point de départ un dimère mixte (glucosane-galactosane) ce qui n'a pas encore pu être réalisé.

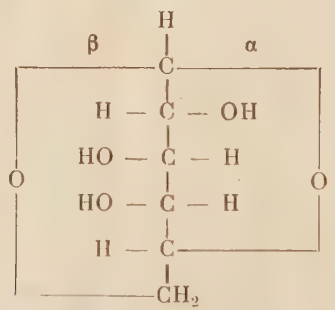
C. — Galactosanes.

Divers anhydrides du galactose ont été obtenus :

1° L'α galactosane (Pictet et Vernet [117]) qui s'hydrolyse en présence d'eau et réduit la liqueur de Fehling à chaud. Elle est considérée comme la *d*-galactosane $<\alpha\ 1,2><\beta\ 1,5>$; c'est l'anhydride du galactose α.

2° Une β galactosane (Pictet et Vogel [119]), de constitution $<1,4><1,5>$ (anhydride du galactose β) qui réduit déjà la liqueur cupropotassique vers 35° .

3° Une *d*-galactosane de synthèse (Micheel [101]) qui réduit plus difficilement la liqueur de Fehling et est lévogyre $[\alpha]_D^{15} = -21°9$. On lui attribue une formule du type *lévoglucosane* $<\alpha\ 1,5><\beta\ 1,6>$:



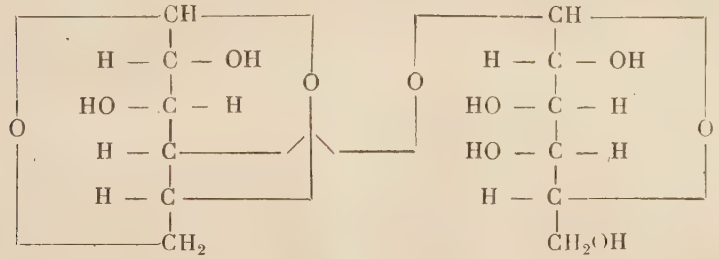
Enfin, un 3-6-anhydro-*d*-galactose de synthèse a été préparé par Ohle et Thiel [107].

D. — Lactosanes.

Par chauffage dans le vide, des anhydrides internes du lactose ont été obtenus. Les propriétés de la lactosane, comme celle de la galactosane, sont si semblables à celles de la glucosane qu'on doit leur attribuer une constitution analogue. Il faut admettre que la molécule de ces deux anhydrides contient aussi un anneau oxyde d'éthylène.

Parmi les lactosanes de synthèse, on peut citer : 1° La 4[β-*d*-galactosido]-*d*-glucosane <1,2> dérivée de l'acétobromolactose (Pictet et Egan [118]). Elle est dextrogyre, réduit à chaud la liqueur cuproalcaline ; par addition d'eau elle donne du lactose. Des polymères et, même une tétra lactosane, ont été décrits.

2° La < 1,6 > 4-*d*-galactosido-lévoglucosane (Karrer et Harloff [81]) qui est lévogyre $[\alpha]_D^{18} = -44°7$. Contrairement à la précédente elle ne réduit pas la liqueur de Fehling. Sa formule est la suivante :



On voit que galactosanes et lactosanes peuvent avoir des structures différentes et être plus ou moins stables, selon qu'elles se rapprochent du type glucosane ou du type lévoglucosane.

D'après notre hypothèse, une galactosane (type *d*-galactosane de Micheel) constituerait *la partie alcalino-labile* du complexe. Cette galactosane serait assez stable, néanmoins l'ébullition en liqueur alcaline suffirait à provoquer son hydrolyse.

Cette hypothèse présente un double avantage : elle tient compte des résultats de Ritthausen et explique certains faits en apparence paradoxaux des analyses.

III. — Partie acido-stable du complexe : présence d'une lactosane.

Les deux sources envisagées sont susceptibles de fournir deux molécules de galactose, par contre, elles n'expliquent en rien l'apparition, dans les hydrolysats du liquide d'extraction, d'une nouvelle molécule de galactose et surtout d'une molécule de glucose. Il reste donc à déterminer la nature de ce troisième constituant et tout d'abord à rechercher si l'oside hydrolysable en glucose et galactose peut être identifié à l'un des diholosides connus.

Diholosides générateurs de glucose et galactose.

Parmi eux, citons le *mélibiose*, le *galactosido-glucose* (*) (Fischer), le 6[β-d-*glucosido*]-d-*galactose* [**51**] (Freudenberg), de pouvoir rotatoire faible ($[\alpha]_D^{18°} = +13°9$, *l'allolactose* (**) probablement identique au 6[β-d-*galactosido*]-d-*glucose* de Helferich et Rauch [**65**], le *glucosido-galactose*, l'*isolactose* de synthèse (***) (Fischer et Armstrong [**46**]) ; tous donnent des osazones.

Peut-on admettre la présence d'un de ces holosides ? D'examens successifs, il ressort que le corps générateur de glucose et de galactose, entrant dans la composition du complexe est assez stable, puisque l'hydrolyse acide doit être prolongée 45 minutes à 110° pour être totale. Tout d'abord, l'absence de pouvoir réducteur et de pouvoir rotatoire des liquides, la non obtention d'osazones font rejeter la présence de l'un de ces osides à l'état de liberté.

Dans le cas où l'un d'entre eux entrerait à l'état de combinaison, l'absence de pouvoir réducteur et de pouvoir rotatoire serait dû au fait qu'il aurait sa fonction aldéhyde bloquée par suite d'une liaison avec un autre corps existant dans le complexe. Mais alors, sous l'action d'une hydrolyse faible, il devrait être libéré et, à ce moment, la propriété de donner des

(*) Ce *galactosido-glucose* n'est pas identique, comme l'avait cru Fischer, au *mélibiose* retiré par hydrolyse incomplète du raffinose (Schlubach et Rauchenberger [**136**]).

(**) Un *néolactose* [**128**], disaccharide de synthèse, doit être éliminé d'emblée car il donne du *d*-altrose par hydrolyse.

(***) Rappelons que la différenciation du lactose et de l'isolactose repose sur le fait que le premier seul est attaqué par la lactase retirée des amandes, tandis que les deux sont dédoublés par la lactase du Kéfir, ce qui explique une divergence dans la structure de ces deux isomères.

osazones apparaîtrait. Or, si l'on pratique une hydrolyse ménagée (en utilisant une acidité plus faible et un temps de chauffe moindre), on n'obtient, après action de la phénylhydrazine, aucune osazone soluble qui puisse caractériser la formation d'un de ces bioses.

Maintenant nous allons envisager deux hypothèses concernant la nature du composé glucidique constituant la partie acido-stable du complexe : la première a trait à la présence d'un diholoside, type gynolactose, la seconde à celle d'une lactosane.

Gynolactose.

A côté du lactose existerait, dans le lait de Femme, comme nous l'avons indiqué, un diholoside : le *gynolactose*. Celui-ci, faiblement lévogyre, peu réducteur, se conduit, d'après Polonovski et Lespagnol [122], de façon anormale vis-à-vis de l'iode en milieu alcalin : « Les solutions de gynolactose fixent beaucoup moins d'iode que les solutions de lactose à concentration égale. Elles fixent même moins d'iode qu'une solution de lactose de même pouvoir réducteur à la liqueur cupropotassique de Bertrand : elles en fixent environ les deux tiers ».

Cet holoside, d'après eux, est formé de glucose et de galactose. Dans une première série de recherches [120], ils caractérisent « le galactose, dans les produits d'hydrolyse, par examen microscopique de la galactosazone et par oxydation nitrique qui donne lieu à une production d'acide mucique ». « Nous n'avons pu, disent-ils, mettre en évidence le glucose ». Dans un autre mémoire [121] ils obtiennent, après hydrolyse de ce même sucre, deux osazones : « a) l'une assez soluble à chaud, présentant au microscope l'aspect de la galactosazone ; b) l'autre apparaissant au bain-marie et présentant les caractères de solubilité de la glucosazone ». Toutefois, malgré des cristallisations répétées, ils n'ont jamais retrouvé les gerbes classiques de la glucosazone.

Enfin Polonovski et Lespagnol concluent « qu'il existe, à côté du gynolactose dont les caractères de pureté demandent à être précisés, d'autres produits glucidiques beaucoup moins réducteurs encore ».

En résumé, le gynolactose possède un faible pouvoir rotatoire gauche, il est peu réducteur et ne donne pas d'osazones. L'existence, dans la partie acido-stable du complexe, de ce diholoside, ou d'un diholoside de ce type encore moins réduc-

teur, lié ou non avec la galactosane dont nous avons admis la présence, peut être envisagée. Toutefois, les essais tentés pour l'isolement de ce corps à l'état cristallisé n'ont pas abouti, sans doute aussi à cause de la faible quantité de matière première dont nous disposions.

Lactosane.

Une autre hypothèse, au moins aussi séduisante, est celle de la libération de glucose et de galactose aux dépens d'une lactosane dans la constitution serait voisine de la <1-6>4-*d*-galactosido-lévoglucosane de Karrer et Harloff.

La galactosane envisagée précédemment et cette lactosane peuvent être, dans le complexe originel, simplement « associées » sans que les valences principales soient mises en jeu, comme dans la polymérisation. Une telle conception a été formulée par Irvine et Mac Donald, lorsqu'ils envisagent l'amidon comme une « association » de saccharides, les différents groupes étant liés entre eux par des valences secondaires.

Il est également possible que galactosane et lactosane soient unies entre elles sous forme de trihexosane ; ce qui n'empêcherait pas la liaison de la trihexosane elle-même avec un autre corps dans le complexe.

En effet, on connaît la facilité de polymérisation et de condensation de ces composés avec d'autres corps, facilité qu'ils doivent à la présence dans leur formule de cycles analogues à ceux des formes instables des sucres. De ce point de vue, rappelons qu'une trihexosane, provenant d'une dépolymérisation directe de l'amidon, donne successivement du glucose et une dihexosane qui est un anhydride du maltose.

La formation d'hexosanes est, d'après Pictet, très vraisemblable chez les êtres vivants. Elle serait particulièrement facile chez les végétaux sous l'action catalysante des enzymes, dans des cellules où règnent des pressions qui, selon Pfeffer, peuvent atteindre jusqu'à 40 atmosphères.

La synthèse du lactose par voie chimique, non réalisable par hydrolyse partielle d'une dihexosane (en prenant comme point de départ un dimère mixte formé de glucosane et de galactosane), s'effectue cependant à partir du β glucose et du β galactose. Cette synthèse toutefois nécessite une transformation nécessaire et préalable du β galactose en β galactosane :

1er temps : β galactose ----➤ β galactosane
2e temps : β galactosane + β glucose ——➤ lactose

La formule du lactose et celle de la <1.6>4-*d*-galactosido-lévoglucosane de Karrer et Harloff présentent une grande analogie. En admettant, dans le complexe, la présence d'une lactosane de ce type, il devient dès lors possible de considérer cette dihexosane comme un des précurseurs du lactose dans l'organisme : le processus biologique rejoignant ici la synthèse chimique. On retrouverait ainsi en cette lactosane la substance mère du lactose pressentie par Paul Bert, ou le « lactose precursor » de Weinbach. Cette conception paraît d'autant plus vraisemblable que nos glucides sont mis en évidence dans des laits prélevés pendant la première semaine qui suit l'accouchement et au moment où la glande mammaire est en pleine évolution - - dans lesquels l'équilibre glucidique et la teneur constante « en sucre » ne sont pas encore réalisés, c'est-à-dire dans des laits non « stabilisés ».

CONCLUSIONS GÉNÉRALES.

Sans revenir sur les conclusions particulières qui ont été formulées à la fin des différents chapitres, nous rappellerons brièvement les idées générales et les faits qui se dégagent de l'ensemble du présent travail.

Dans le lait, on envisage généralement, comme glucides, le seul lactose qu'il est classique, après désalbumination mercurique, de doser (macrodosage) par les liqueurs mercuro ou cuproalcalines.

1° Nous avons fait l'étude comparative, sur de nombreux laits de Femme individuels, de divers déprotéinants et dosé les glucides par 2 méthodes différentes : l'une, celle de BERTRAND, prise comme standard, évaluant tous les sucres réducteurs, l'autre, méthode iodométrique, spécifique des seuls aldoses. Nous avons adapté, pour la première fois, cette dernière à la micro-analyse du lait, ce qui nous a permis d'effectuer tous les dosages comparatifs sur des filtrats provenant du traitement de 1 cm^3 seulement de lait.

2° *L'étude de divers désalbuminants* (acide silicotungstique, sels de Hg, etc.) montre que leur pouvoir de déprotéinisation n'est pas équivalent. Certains (sels de Hg) éliminent du lait de Femme une substance qui est de nature glucidique. Dès lors, il devient possible, en comparant les chiffres obtenus pour un même lait, traité d'une part par l'acide silicotungstique, d'autre part par les sels mercuriques, d'établir, par différence, une évaluation de ce que l'on peut appeler un « *indosé glucidique* », représenté par des sucres non encore signalés dans le lait.

3° De nos recherches fort nombreuses ressortent les conclusions pratiques suivantes : pour une *estimation globale des glucides* dans le lait de Femme, on peut se contenter d'un simple dosage par la méthode de BERTRAND sur un lait préalablement désalbuminé par l'acide silicotungstique ; mais une *analyse plus complète* réclame la préparation, à partir d'un

même lait, de 2 filtrats de déprotéinisation, l'un silicotungstique, l'autre mercurique, et un double dosage effectué par la méthode cuproalcaline et la méthode iodométrique sur chacun des 2 filtrats ainsi désalbuminés.

4° *L'examen polarimétrique*, contrairement à ce qui se passe pour les laits de Vache et de Chèvre, ne peut fournir, dans l'analyse d'un lait de Femme, qu'un complément d'information.

5° Un « *indosé glucidique* », mais de nature différente, semble exister, en petites quantités, dans les laits de Vache et de Chèvre.

6° *La teneur en lactose*, faible dans le liquide prénatal, devient plus basse encore dans la sécrétion obtenue au moment même de l'accouchement, puis croît dans le lait jusqu'au 12e ou 15e jour qui suit la naissance, pour se stabiliser aux environs de 65-70 g. par litre. Elle devient alors indépendante de la phase de la tétée, du moment du prélèvement. Comme dans divers cas pathologiques le taux du lactose baisse sensiblement, un simple dosage de lactose présente donc un grand intérêt et donne une première information importante sur la valeur alimentaire d'un lait.

7° Nous avons démontré que les sels de mercure précipitent dans le lait de Femme, préalablement débarrassé de ses protéines, un complexe (complexe originel) renfermant : (a) une substance organique rappelant par ses caractères le composé isolé par Ritthausen, (b) des sels, et (c) des glucides qui forment la masse principale.

8° La méthode d'extraction utilisée permet de caractériser, à partir du précipité mercurique les constituants du complexe primitif. Parmi eux 2 aldoses (galactose et glucose) ont été nettement mis en évidence dans les liqueurs d'extraction où ils se trouvent dans la proportion de 3 molécules du premier pour 1 molécule du second.

9° L'étude méthodique de la fraction glucidique prouve que l'on peut distinguer 3 parties dans le complexe originel : une *portion acido-labile* qui correspond à la présence primitive d'un ester phosphorique du galactose dont la déphosphorylation, au cours des manipulations d'extraction, est marquée par une libération de galactose et de P ; une *partie alcalino-labile*

qui contient un corps donnant naissance à du galactose, cette « substance galactogène » appartenant probablement au groupe des hexosanes ; enfin 3° une *partie acido-stable* qui, susceptible de se scinder en galactose et glucose, est vraisemblablement constituée par une lactosane particulière. On peut ainsi se faire une idée de la structure du complexe à l'état primitif.

10° La présence, dans le lait de Femme, de tels composés non encore décrits, offre non seulement un intérêt pratique en ce qui concerne les dosages des glucides dans ce lait, mais aussi un intérêt biologique évident touchant la genèse du lactose. Ces diverses considérations ont été discutées.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Adriano (F.). — *The Philippine Journ. of Science*, 1920, **17**, 213-220.
2. Allan et Wiles. — *Journ. of Physiol.*, 1932, **75**, 23.
3. Auerbach et Bodlander. — *Zeits. für ang. Chem.*, 1923, **36**, 36.
4. Baker et Hulton. — *Biochem. Journ.*, 1920, **14**, 754.
5. Baudouin (A.) et Lewin (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, **9**, 280-309.
6. Baudouin (A.). — *Bull. Soc. Chim. biol*, 1928, **10**, 977-1049.
7. Bechamp. — Conférences faites à la Soc. chimique Paris, 1889-1892.
8. Bergman (A. J.) et Turner (C. W.). — *J. Biol. Chem.*, 1937, **118**, 247.
9. Bernheim et Schlayer. — *Z. Klin. Med.*, 1925, **102**, 369.
10. Bertrand (G.). — *Bull. des Sciences Pharmacol.*, 1907, **14**, 7-18.
11. Bierry (H.). — Recherches sur les diastases qui concourent à la digestion des hydrates de carbone. *Thèse Doct. ès Sciences* Paris, 1911.
12. Bierry (H.) et Rathery (F.). — Introduction à la Physiologie des Sucres. 1 vol. Baillière, Paris, 1935, p. 219-224.
13. Bierry (H), Gouzon (B.) et Magnan (C.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1933, **196**, 862.
14. Bierry (Magd.) et Dumazert (C.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 737.
15. Bierry (Magd.) et Dumazert (C.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 1029.
16. Bierry (Magd.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 857.
17. Blackwood (J. H.) et Stirling (J. D.). — *Biochem. Journ.*, 1932, **26**, 362-368.
18. Blond et Llyod. — *Journ. Soc. chim. ind.*, 1914, **33**, 948.
19. Blot. — *C. R. Acad. Sc.*, 1856, **43**, 676.
20. Bosworth (A. W.). — *Amer. Journ. of Diseases of children*, 2 août 1921.
21. Bosworth (A. W.) et Brown (J. B.). — *J. Biol. Chem.*, 1933, **103**, 115.
22. Bosworth (A. W.). — *J. Biol. Chem.*, 1934, **106**, 235.
23. Bouchara (E.). — Précipitation des Protides du Lait. *Thèse Doct. Pharmacie*, 1 vol. 168 p., Paris, 1931.
24. Bouchardat (G.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1871, **73**, 462.
25. Bougault (J.). — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1917, **16**, 33-45 et 97-313.
26. Brachin (A.). — Recherches sur la Lactase. *Thèse Doct. Pharmacie*, Paris 1904.
27. Bradley. — *J. Biol. Chem.*, 1912, **13**, 431.
28. Briggs (A. P.). — *J. Biol. Chem.*, 1922, **53**, 13 et 1924, **59**, 255.

29. Carrez. — In Précis de Chimie Analytique par Denigès (G.), Chelle (L.) et Labat, éditions Maloine, Paris, 1931, **2**, 380.
30. Chamorro (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1940, **134**, 225 et 1941, **135**, 153.
31. Colin (H.) et Lievin (O.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1918, **47**, 403.
32. Corner. — *Amer. Journ. of Physiol.*, 1930, **95**, 43.
33. Daoud (K. M.). — *Biochem. Journ.*, 1940, **34**, 1-6.
34. De Bruyn et van Ekenstein. — *Rec. des Tr. chim. des Pays-Bas*, 1895, **14**, 158 et 203.
35. Denigès (G.). — Contribution à l'étude des lactoses. *Thèse Doct. Pharmacie*, Paris 1892.
36. Denigès (G.), Chelle (L.) et Labat. — Précis de Chimie Analytique. (édit. Maloine) Paris, 1931, **2**, 360-425.
37. Dumazert (C.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **16**, 932 et *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 570.
38. Esbach. *Journ. des connais. méd.*, 1880, n° 3 à 16.
39. Esbach. — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1888, **17**, (5), 533.
40. Evans. — *Proc. Soc. exp. Biol.* N. Y., 1933, **30**, 1370.
41. Evans. — *Amer. Journ. of Physiol.*, 1936, **116**, Proc. 45.
42. Everett, Sheppard et Johson. — *J. Biol. Chem.*, 1934, **104**, 1.
43. Fellner. — *Klin. Wochenschrift*, 1931, **10**, 1167.
44. Fine (J.). — *Biochem. Journ.*, 1932, **26**, 569-572.
45. Fischer (E.). — *Ber. d. d. chem. ges.*, 1908, **41**, 73.
46. Fischer (E.) et Armstrong (E. F.). — *Ber. d. d. chem. ges.*, 1902, **35**. 3144.
47. Fleury (P.) et Marque (J.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, **12**, 61.
48. Foa (C.). — *Arch. di Fisologia*, 1908, **5**, 533.
49. Folin (O.) et Wu (H.). — *J. Biol. Chem.*, 1919, **38**, 81 et 1920, **41**, 368.
50. Fontes (G.) et Thivolle (L.). — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1922, **4**, 23 et 1927, **9**, 353.
51. Freudenberg (K.), Wolf (A.), Knopf (E.) et Zaheer (S. H.). — *Ber. d. d. chem. ges.*, 1928, **61**, 1746.
52. Gale (E. F.). — *Biochem. Journ.*, 1937, **31**, 234.
53. Gardner et Turner. — *Missouri Agric. Research Bull.*, 1933, n° 196.
54. Geschicker (V. L.). — *Arch. of Surgery Chicago*, 1936, **32**, 598.
55. Giberton (A.). — Contribution à l'étude chimique et biologique de quelques sucres. *Thèse Doct. Méd.*, Paris 1925.
56. Gomez (E. T.) et Turner (C. W.). — *Missouri Agric. Research Bull.*, 1937, n° 259, et *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1938, **37**, 607.
57. Gomez (E. T.) et Turner (C. W.). — *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.*, 1936, **34**, 320.
58. Grant (G. A.). — *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 1661-1905.
59. Grant (G. A.). — *Biochem. Journ.*, 1936, **30**, 2027.
60. Guiraud. — Le lait de femme à l'état physiologique. *Thèse Méd. Bordeaux* 1897.
61. Hagedorn et Jensen. — Ugeskrift for Läger, 1918, n° 31 et *Biochem. Zts.*, 1923, **135**, 46.
62. Hans-Weiss. — D'après *Le Lait*, 1922, **2**, 123.
63. Harned. — *Journ. Biol. Chem.*, 1925, **55**, 555.
64. Haworth (W. N.) et Long (C. W.). — *Journ. chem. Soc.*, 1927, p. 544.
65. Helferich (B.) et Rauch (H.). — *Ber. d. d. Chem. ges.*, 1926, **59**, 2655.

66. Helferich (B.) et Sparmberg. — *Ber. d. d. Chem. ges.*, 1933, **66**, 806.
67. Helferich (B.). — *Ergebn. Enzymforsch.*, 1933, **2**, 74.
68. Hilditch (T. P.) et Paul (H.). — *Biochem. Journ.*, 1936, **30**, 1905.
69. Hilditch (T. P.) et Sleightholme. — *Biochem. Journ.*, 1931, **25**, 507.
70. Hinton et Macara. — *Analyst.*, 1927, **52**, 558.
71. Hofmeister. — *Zts. f. physiol. chem.*, 1877, **1**, 101.
72. Houssay (B. A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **120**, 496 et 502.
73. Hubbard (R. S.) et Allison (C. B.). — *Proc. Soc. exp. Biol. and Méd.*, 1928, **25**, 408.
74. Hubbard (R. S.) et Brock (H. J.). — *J. Biol. Chem.*, 1935, **110**, 411.
75. Irvine (J. C.) et Oldham (J. W. H.). — *Journ. chem. Soc.*, 1925, **127**, 2903-2922.
76. Jonesco. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, **10**, 252.
77. de Jongh (A. H.) et Dingemanse. — *Arch. neerland Physiol.*, 1932, **16**, 288.
78. de Jongh (A. H.). — *Act. brevia neerland Physiol.*, 1933, **3**, 52.
79. Judd (H. M.). — *Biochem. Journ.*, 1920, **14**, 255-262.
80. Kaltenbach. — *Zts. f. physiol. chem.*, 1878-1879, **2**, 360.
81. Karrer (P.) et Harloff (J. H.). — *Helv. chim. Acta*, 1933, **16**, 962.
82. Kauffmann et Magne. — *C. R. Acad. Sc.*, 1906, **143**, 779.
83. Kay (H.) et Marshall (P. G.). — *Biochem. Journ.*, 1928, **22**, 416.
84. Kayser. — *Ann. Inst. Pasteur*, 1891, p. 395.
85. Kent et Tollens. — *Liebig's Annal. d. chem.*, 1885, **227**, 221.
86. Kleiner et Tauber. — *J. Biol. Chem.*, 1932, **99**, 241.
87. Kolthoff. — *Z. Unter. Nahr. Genuss.*, 1923, **45**, 141.
88. Kosterlitz (A. W.). — *Biochem. Journ.*, 1939, **33**, 1087-1093.
89. Kurzrock, Bates, Riddle et Miller. — *Endocrinology*, 1934, n° 1, 18.
90. Landwehr. — *Ber. d. d. chem. ges.*, 1886, **19**, 258 et *Pflüger's Archiv.*, 1887, **40**, 21 et *Zts. f. physiol. chem.*, 1885, **9**, 361.
91. Lenstrup (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1926, **70**, 193-202.
92. Levene (P.), Raymond (A.) et Walti. — *J. Biol. Chem.*, 1929, **82**, 191.
93. Levene (P.) et Raymond (A.). — *J. Biol. Chem.*, 1931, **92**, 765.
94. Lewis (R. C.) et Benedict (S. R.). — *J. Biol. Chem.*, 1915, **20**, 61-72.
95. Lowenfeld (M. F.), Widdows (S. T.), Bond (M.). — *Biochem. Journ.*, 1927, **21**, 1.
96. Lyons (W. R.). — *Proc. Soc. exp. Biol. and Méd.*, 1937, **35**. 645.
97. Mac Lean (H.). — Modern methods in Diagnosis and Treatment of Glycosuria and Diabetes. 4e édition. Londres. 1927, p. 61 (Constable et Cie édit.).
98. Macleod (M.) et Robison (R.). — *Biochem. Journ.*, 1929, **23**, 517-529.
99. Marshall et Kirkness. — *Biochem. Journ.*, 1907, **2**, 1.
100. May. — *Zts. f. Biol.*, 1932, **95**, 277-614.
101. Micheel (F.). — *Ber. d. d. Chem. ges.*, 1929, **62**, 687.
102. Michlin et Lewitow. — *Biochem. Zts.*, 1934, **271**, 448.
103. Moore et Parker. — *Amer. Journ. of Physiol.*, 1900, **4**, 239.

104. Müntz. — *Ann. de Chim et de Phys.*, 1877, (5), **10**, 566.
105. Nef (U.). — *Liebig's Annal.*, 1900, **19**, 1 et 10 ; et 1910, **26**, 1.
106. Nelson et Gaunt. — *Proc. Soc. exp. Biol. N. Y.*, 1936, **34**, 671.
107. Ohle (H.) et Thiele (H.). — *Ber. d. d. chem. ges.*, 1933, **66**, 525.
108. Oldham (J. W. H.) et Robertson (G. J.). — *Journ. chem. Soc.*, 1935, Part. I, 685.
109. Paccard (R.). — Etudes sur le Lait de Femme. *Thèse doct. Pharm.*, Lyon 1937.
110. Paget (M.) et Dupont (M^lle Y.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 1536.
111. Pacini (A. J. P.) et Russel (D. W.). — *J. Biol. chem.*, 1918, **34**, 505.
112. Pappel (A.) et Droop Richmond (H.). — *Journ. chem. Soc. of London*, 1890, **57**, 754.
113. Patein et Dufau. — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1902, (6), **16**, 223.
114. Pauchard. — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1926, **1**, 248.
115. Perrier (M.). — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1920, **22**, 337.
116. Pichon-Vendeuil (J. E.). — *Bull. Soc. Pharmacol.*, 1921, **28**, 360.
117. Pictet (A.) et Vernet (H.). — *Helv. chimic. Acta.*, 1922, **5**, 444.
118. Pictet (A.) et Egan (M. M.). — *Helv. chim. Act.*, 1924, **7**, 295.
119. Pictet (A) et Vogel (H.). — *Helv. chem. Act.*, 1927, **11**, 210.
120 Polonovski (M.) et Lespagnol (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1930, **12**, 1170.
121. Polonovski (M.) et Lespagnol (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **104**, 553-557.
122. Polonovski (M.) et Lespagnol (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 301-305.
123. Polonovski (M), Cuvelier (L.) et Avenard (R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 6.
124. Polonovski (M.) et Lespagnol (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1933, **15**, 320-349.
125. Porcher (Ch.). — *Arch. intern. Physiol.*, nov. 1909, p. 360 et *C. R. Soc. Biol.*, 28 juillet 1906.
126. Porcher (Ch.). — De la Lactosurie. Monographies cliniques, 1906, n° 45.
127. Porcher (Ch.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1903, 3^e série, 29, 828.
128. Richtmyer (N. K.) et Hudson (C. S.). — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1935, **57**, 1716.
129. Riddles, Bates et Dykshorn. — *Amer. Journ. of Physiol.*, 1933, **105**, 191.
130. Ritthausen. — *Journ. f. präk. chem.*, 1877, **15**, 329.
131. Robison (R.). — *Nature*, 1927, **120**, 44.
132. Romijn. — *Z. Anal. Chem.*, 1897, **36**, 349.
133. Otto Ruff. — *Ber. d. d. Pharm. gesell.*, 1900, **7**, 43.
134. Salomon, Hold et Peters. — *J. Biol. Chem.*, 1940, **132**, 723.
135. Schmöger, — *Central f. Agric. ch.*, 1885, p. 130.
136. Schlubach et Rauchenberger. — *Ber. d. d. Chem. ges.*, 1925, **58**, 177-239 et 1184.
137. Selye (H.), Collip (J. B.) et Thomson (D. L.). — *Proc. Soc. exp. Biol. and Méd.*, 1933, **30**, 588.
138. Selye (H.), Collip (J. B.), Thomson (D. L.). — *Endocrinology*, 1934, **18**, 237.

139. Selye (H.), Collip (J. B.) et Thomson (D. L.). — *Proc. Soc. exp. Biol. and Méd.*, 1935, **32**, 1377.
140. de Sinety. — *C. R. Soc. Biol.*, 1879, p. 301.
141. Sjollema (B.). — *Biochem. Z.*, 1927 a, **182**, 453 et 1927 b, **185**, 355.
142. Smith (J. A. B.). — *Biochem. Journ.*, 1938, **32**, 1868.
143. Smith (P. K.) et Smith (A. H.). — *Amer. Journ. of Physiol.*, 1934, février, 356.
144. Soichoro Miura. — *Act. Schoelae Med. Univers. Kioto*, 1917, **2**, fasc. 4, p. 413-423.
145. Stricker et Grueter. — *Presse Médicale*, 1929, **37**, 1268.
146. Svanberg. — *Zts. f. physiol. Chem.*, 1930, **188**, 207.
147. Tanret (C.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1902, **27**, 947.
148. Tanret (C.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1905, **33**, 256.
149. Turner et Gardner. — *Missouri Agric. Research Bull.*, 1931, N° 158.
150. Van der Haar. — *Rec. trav. Pays-Bas et Belg.*, 1918, **37**, 108-110.
151. Vogel (H.) et Deboroska-Kurnicka (H.). — *Helv. chim. Acta*, 1928, **11**, 910.
152. Votocek (E.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1921, **29-30**, 405.
153. Watkins. — *J. Biol. chem.*, 1928, **80**, 33.
154. Weinbach. — *J. Gen. Physiol.*, 1936, **19**, 829.
155. White (A.), Catchpole (H. R.) et Long (C. N. H.). — *Science*, 1937, **86**, 821.
156. Widdows (S. T.). — *Biochem. Journ.*, 1923, **17**, 34.
157. Widdows (S. T.), Lowenfeld (M. F.), Bond (M.) et Taylor (E. I.). — *Biochem. Journ.*, 1930, **24**, 327.
158. Widdows (S .T.) et Lowenfeld (M. F.). — *Biochem. Journ.*, 1933, **27**, 1400.
159. Widdows (S. T.), Lowenfeld (M. F.) Bond (M.), Shiskin (C.) et Taylor (E. I.). — *Biochem. Journ.*, 1935, **29**, 1144.
160. Wilbur (P. C.) et Spoehr (H. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1926, **69**, 421.
161. Wiley (H. W.). — *Amer. Chem. Journ.*, 1884, (6), p. 289.
162. Willstätter et Shudel. — *Ber. d. d. chem. ges.*, 1918, **51**, 780.
163. Wilson. — *Biochem. Journ.*, 1940, **34**, 316.
164. Winter (L. B.). — *Journ. of Physiol.*, 1931, **71**, 341-355.
165. Winter (L. B.). — *Journ. of Physiol.*, 1932, **77**, 100.
166. Wolff (R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 673.

TABLE DES MATIÈRES.

Pages

Avant-propos 5

CHAPITRE I.

Le lait 7

Généralités sur sa constitution 7

Composition du lait chez les diverses espèces animales. 8

Les composants du lait 10

A. Matières minérales 10

B. Composés organiques 12

Composition moyenne du lait de Femme et du lait de Vache 19

CHAPITRE II.

Les glucides du lait 20

Le lactose 21

A. Généralités 21

B. Constitution stéréochimique 23

Gynolactose 28

Allolactose 29

Autres glucides 31

CHAPITRE III.

Formation du lactose 32

I. Physiologie de la glande mammaire touchant la formation du lactose 33

II. Circonstances dans lesquelles le lactose peut passer dans l'urine et dans le sang 35

A. Sucre urinaire pendant la grossesse et après l'accouchement 35

B. Lactosémie 37

III. Sources du lactose 39

IV. Mécanisme de formation du lactose 41

CHAPITRE IV.

Glande mammaire et sécrétion lactée 46

I. Phases du développement de la glande mammaire. 46

II. Influence de l'ovaire sur l'hypertrophie mammaire gravidique 48
III. Déterminisme de la sécrétion lactée 52
A. Influence du système nerveux 52
B. Contrôle hormonal de la glande mammaire 53
IV. Etat d'équilibre hypophyso-ovarien contrôlant la lactation 57
A. Déclenchement de la lactation 57
1° Inhibition hypophysaire 57
2° Stimulation nerveuse 58
B. Maintien de la sécrétion lactée 58
V. Action physiologique de la prolactine 60
A. Utilisation clinique pour obtention d'une sécrétion lactée véritable 60
B. Lactation en dehors de toute gestation.. 62
1° Faits expérimentaux 62
2° La sécrétion est-elle du « lait » ?.... 62
C. Maintien d'une lactation normale 64
VI. Lactations anormales 64
A. Lactation du nouveau-né 64
B. Lactations physiologiques chez la Femme. 65
VII. Lactation chez les diabétiques 65

Chapitre V.

Dosages des glucides dans le lait 68
I. Déprotéinisation des liquides biologiques 70
II. Désalbuminants du lait 73
III. Diverses méthodes d'évaluation du lactose dans le lait 75
A. Méthode polarimétrique 75
B. Méthodes basées sur la réduction des liqueurs cuproalcalines 75
C. Méthodes basées sur la réduction d'autres corps que l'oxyde cuivrique 76
D. Méthodes basées sur l'oxydation par les halogènes en milieu alcalin 77
E. Méthodes biologiques 78
Recherches personnelles 79
Premier temps : récolte du lait 79
Deuxième temps : déprotéinisation 80
A. Déprotéinisation par l'acide silicotungstique 80
B. Déprotéinisation par les sels de mercure. 82
a. Déprotéinisation mercuro-cadmique.. 82
b. Déprotéinisation au nitrate mercurique 83
c. Déprotéinisation au sulfate mercurique 85

Troisième temps : dosages 86
A. Méthode de G. Bertrand 86
B. Méthode iodométrique 88
C. Méthode polarimétrique 96

Exposé et discussion des résultats. — Lait de Femme.... 98
I. Déprotéinisation par l'acide silicotungstique 98
II. Déprotéinisation par les sels de mercure 99
III. Comparaison entre les 3 modes de déprotéinisation. 100
IV. Déprotéinisation mercurique du filtrat silicotungstique 101
V. Dosage polarimétrique des filtrats de déprotéinisation 103
VI. Tableau récapitulatif des résultats 106

Etude de laits autres que le lait de Femme 109
Lait de Vache 109
Lait de Chèvre 110

Chapitre VI.

Variations physiologiques du lactose 112
Variations de la teneur en lactose 113
Influence de divers facteurs 114
Lait chez les diabétiques 114
Laits dits toxiques 114

Chapitre VII.

Mise en évidence d'un hydrate de carbone nouveau de structure moléculaire complexe 116

I. Obtention du liquide d'extraction 117
Premier temps : désalbumination primitive 117
Deuxième temps : précipitation 118
Troisième temps : isolement du précipité 118
Quatrième temps : démercurisation 119
Cinquième temps : neutralisation 119

II. Etude du liquide d'extraction 120
A. Réactions de coloration 120
B. Obtention d'osazones 123
1° Généralités sur les osazones 123
2° Préparation des osazones 124
3° Caractérisation des osazones 127
Obtention d'osazones avant hydrolyse 131
Obtention d'osazones après hydrolyse 133

III. Dosages des glucides dans le liquide d'extraction.. 136
A. Détermination du pouvoir rotatoire..... 136
1° Avant hydrolyse 136
2° Après hydrolyse 136
B. Détermination du pouvoir réducteur 137
1° Méthode iodométrique 137
2° Méthode de BERTRAND 137
3° Microméthodes : microbertrand..... 138
HAGEDORN-JENSEN..... 139

Exposé et discussion des résultats 140

Constitution de l'hydrate de carbone complexe éliminé par les sels de mercure 143

I. Partie acido-labile du complexe : présence d'un ester phosphorique du galactose 147

II. Partie alcalino-labile du complexe : présence d'une « substance galactogène » appartenant vraisemblablement au groupe des hexosanes..... 150

III. Partie acido-stable du complexe : présence d'une lactosane 156

Conclusions générales 161

Bibliographie 165

SECONDE THÈSE.

Propositions données par la Faculté :

I. — **Les divers carotènes chez les végétaux et leur parenté avec la vitamine A.**

II. — **Caractères et formation du lignite de Fuveau.**

Vu et approuvé :
Marseille, le 21 Janvier 1943.
Le Doyen de la Faculté des Sciences :
GEORGES CORROY.

Vu et permis d'imprimer :
Aix-en-Provence, le 27 Janvier 1943.
Le Recteur,
PIERRE MARTINO.

M. Declume, imprimeur, Lons-le-Saunier (31.2160).